

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině
Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

MUDr. Lukáš Bajer

Patofyziologie idiopatických střevních zánětů

Vztah k primární sklerózující cholangitidě, transplantaci jater a karcinogenezi

Pathophysiology of inflammatory bowel disease

Relation to primary sclerosing cholangitis, liver transplantation and carcinogenesis

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Pavel Drastich, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Miloslav Kverka, Ph.D.

Praha, 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 3. 3. 2020

.....

MUDr. Lukáš Bajer

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

BAJER, Lukáš. *Patofyziologie idiopatických střevních zánětů ve vztahu k primární sklerózující cholangitidě, transplantaci jater a karcinogenezi. [Pathophysiology of inflammatory bowel disease in relation to primary sclerosing cholangitis, liver transplantation and carcinogenesis]*. Praha, 2020. 121 s. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta; Institut klinické a experimentální medicíny, Klinika hepatogastroenterologie. Školitel: doc. MUDr. Pavel Drastich, Ph.D. Konzultant: MUDr. Miloslav Kverka, Ph.D.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kdo mě v rámci mé vědecké práce v posledních 7 letech odborně i osobně podporovali. Děkuji především svému školiteli panu docentu Pavlu Drastichovi za jeho trpělivé vedení, povzbuzování, přátelství a moudré rady nejen v záležitostech postgraduálního studia. Děkuji mu také za to, že můj klinický a vědecký zájem nasměroval na zajímavá témata prezentovaná v této práci a že byl a nadále je mým medicínským i lidským vzorem. Děkuji svému školiteli-konzultantovi panu doktoru Miloslavu Kverkovi za poskytnutí skvělého zázemí v rámci MBÚ AV, za dlouholetou skvělou spolupráci, za kamarádsky laděné vedení mé práce v laboratoři a za motivaci k završení mého studia. Zároveň děkuji i ostatním kolegům z MBÚ, se kterými jsem v uplynulých letech měl tu čest na společných projektech spolupracovat. Děkuji panu profesoru Juliu Špičákovi za možnost profesního rozvoje v rámci IKEM, a to jak v oblasti klinické, tak experimentální. Děkuji svým milým kolegům Kláře, Honzovi a Peterovi, díky jejichž přátelství jsem schopen velké nároky plynoucí z naší práce zvládat s větším optimismem. Děkuji svým rodičům, že mě během studia na vysoké škole (a dále po něm) vždy plně podporovali. Na závěr ze srdce děkuji své milované ženě Kristýnce za všechny společně strávené roky; za domov, za lásku a za naši krásnou rodinu, bez které by nic z toho, co dělám, nemělo smysl.

Tato disertační práce je věnována památce PaedDr. Jaromíra Jona – sportovce, vysokoškolského pedagoga a skvělého dědečka.

ABSTRAKT

Idiopatické střevní záněty (IBD) jsou skupinou multifaktoriálně podmíněných chorob s celosvětově narůstající incidencí. Dvěma nejlépe definovanými fenotypy jsou Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (UC). Idiopatický střevní zánět doprovázející primární sklerózující cholangitidu (PSC), progresivní onemocnění žlučodů vedoucí k jaterní cirhóze, je pro svá klinická a patofyziologická specifika považován za samostatný fenotyp IBD (tzv. PSC – IBD).

Cílem experimentální části této práce bylo zejména definovat specifika PSC – IBD v klíčových oblastech podílejících se na patogenezi IBD, kterými jsou: složení střevní mikrobioty, porucha střevní bariéry, genetická predispozice a aberantní imunologická odpověď. Dalším cílem práce bylo popsat vztah IBD k transplantaci jater a vzniku neoplazií na základě analýzy klinických dat pacientů sledovaných v zázemí transplantačního centra.

Za použití metod paralelní sekvenace jsme odhalili specifickou kompozici bakteriální a mykobiální mikrobioty u PSC – IBD, která se odlišovala od kompozice u UC a kontrol rekrutovaných ze zdravé české populace. V práci jsme odhalili četné sérové biomarkery, úzce korelující s jednotlivými fenotypy IBD či specifickými klinickými kofaktory. Některé z těchto nálezů prokazují klíčovou úlohu střevní bariéry v patogenezi zkoumaných chorob. Zároveň jsme charakterizovali protilátkovou a buněčnou odpověď, která u různých podtypů IBD vykazovala signifikantní rozdíly. Na největším českém souboru pacientů po transplantaci jater pro PSC jsme v rámci retrospektivní studie prokázali klíčovou úlohu střevního zánětu na míru rekurence PSC, a tím i na prognózu jaterního štěpu. V dané kohortě pacientů jsme pomocí HLA-typizace taktéž prokázali význam genetické predispozice. U pacientů transplantovaných pro PSC jsme též zhodnotili riziko rozvoje biliárních a kolorektálních neoplazií. U pacientů resekovaných pro fokální pankreatickou masu jsme popsali vztah autoimunitní pankreatitidy (choroby významně asociované s IBD) k rozvoji karcinomu slinivky břišní.

Na výsledky této práce v budoucnu navážou další projekty v dané výzkumné oblasti. Prezentované závěry mohou dopomoci ke stanovení pro praxi relevantních biomarkerů či terapeutických cílů a k identifikaci pacientů se zvýšeným klinickým rizikem.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) represents a group of multifactorial illnesses with increasing incidence worldwide. Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two most thoroughly defined phenotypes of IBD. IBD associated with primary sclerosing cholangitis (PSC) – a progressive biliary disease leading to cirrhosis and liver failure – is considered as specific IBD phenotype (also referred to as 'PSC – IBD') due to its clinical and pathophysiological characteristics.

The aim of the experimental part of this thesis was to define specific features of PSC – IBD in the key areas of IBD pathogenesis. These are: microbiota composition, gut – barrier failure, genetic predisposition and aberrant cellular and antibody immune response. Furthermore, the other goals were to describe relation of IBD status and activity to liver transplantation (LTx) and carcinogenesis based on thorough analysis of clinical data in patients under surveillance at the liver transplantation unit.

Using the next-generation parallel sequencing technology, we discovered specific bacterial and mycobial features of gut microbiota composition in PSC – IBD which significantly differed from UC and healthy controls recruited from Czech general population. Moreover, we identified numerous seral biomarkers distinguishing CD, UC and PSC – IBD and/or reflecting disease and treatment status. Some of these findings stress out the importance of gut barrier dysfunction in IBD. Additionally, we characterised antibody and cellular immune response showing significant variations among IBD phenotypes. Within the retrospective study analysing the largest Czech set of patients after LTx for PSC up-to-date we revealed that IBD status has a crucial impact on PSC recurrence rate and therefore the liver graft prognosis. After HLA-typing of subject cohort of patients involved, we also demonstrated the genetic predisposition importance regarding this issue. Additionally, we evaluated risk of biliary and colorectal neoplasia development in context of LTx for PSC. Lastly, we revealed a significant correlation between autoimmune pancreatitis (condition significantly associated with IBD) and pancreatic carcinoma in patients resected for focal pancreatic mass.

In future, the data presented in this thesis will be followed by further projects with similar research focus. Our results may significantly contribute to establishing suitable clinical biomarkers and/or therapeutic goals and identifying high – risk patients.

KLÍČOVÁ SLOVA

Idiopatické střevní záněty, primární sklerózující cholangitida, ulcerózní kolitida, Crohnova choroba, transplantace jater, mikrobiota, střevní bariéra, biomarkery, neoplazie

KEYWORDS

Inflammatory bowel disease, primary sclerosing cholangitis, ulcerative colitis, Crohn's disease, liver transplantation, microbiota, gut barrier, biomarkers, neoplasia

OBSAH

ÚVOD	11
HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	19
PUBLIKACE 1	20
PUBLIKACE 2	27
PUBLIKACE 3	39
PUBLIKACE 4	47
PUBLIKACE 5	68
PUBLIKACE 6	77
PUBLIKACE 7	89
PUBLIKACE 8	99
SOUHRNNÁ DISKUSE.....	109
ZÁVĚR A SHRUTÍ	114
LITERÁRNÍ REFERENCE	115

SEZNAM ZKRATEK (použitých v abstraktu, úvodu a diskusi)

AIP	autoimunitní pankreatitida
ASCA	anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> antibodies
ATG16L1	autophagy related 16 like 1
CARD15	caspase recruitment domain-containing protein 15
CD	Crohnova choroba
CNTN6	gen pro Contactin 6
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EG-VEGF	endocrine gland-derived vascular endothelial growth gactor
ELTR	Evropský registr pro transplantace jater
GWAS	genome-wide association study
HLA	hlavní histokompatibilní index
ChP	chronická pankreatitida
IBD	idiopatické střevní záněty
IFN-γ	interferon gama
IgA, IgG4	imunoglobulin A, imunoglobulin G4
IL	interleukin
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein
JAM	junctional adhesion molecule
LTx	transplantace jater
MDP	muramyl dipeptid
MMPs	matrixové metaloproteinázy
NGS	next-generation sequencing
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OPG	osteoprotegerin

PRRs	pattern recognition receptors
PSC	primární sklerózující cholangitida
PSC – IBD	idiopatický střevní zánět asociovaný s primární sklerózující cholangitidou
rPSC	rekurentní forma primární sklerózující cholangitidy
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteináz
TLR	toll-like receptor
UEGW	United European Gastroenterology Week
UC	ulcerózní kolitida

ÚVOD

Idiopatické střevní záněty – Crohnova choroba a ulcerózní kolitida

Idiopatické střevní záněty (IBD) představují skupinu chorob reprezentovanou dvěma hlavními fenotypy – Crohnovou chorobou (CD) a ulcerózní kolitidou (UC). Jedná se o onemocnění charakterizovaná chronickým zánětem se střídáním období relapsu a remise.¹ Nejen kvůli jejich vysoké prevalenci a ve velké části světa narůstající incidenci tvoří v dnešní době významný celosvětový socioekonomický problém.^{2,3}

Ulcerózní kolitida je tradičně definována jako kontinuální chronický zánět sliznice rektu s různým rozsahem postižení tračníku a absencí granulomů při histologickém vyšetření.⁴ Granulomatózní zánět u Crohnovy choroby má naproti tomu transmurální a diskontinuální charakter. Na rozdíl od UC může navíc postihovat kteroukoliv část trávicí trubice, nejčastěji se však setkáváme s ileocékální formou a perianální chorobou. CD je navíc často spojena s komplikacemi, jako jsou píštěle, striktury a abscesy.⁵ Termín „indeterminovaná kolitida“ je pak rezervován pro histologické hodnocení zánětu tlustého střeva, u kterého nelze jednoznačně určit, zda se jedná o UC, či CD, a nejedná se tedy v pravém slova smyslu o samostatný fenotyp IBD.^{4, 6} Dle některých literárních zdrojů se mezi minoritní podtypy IBD řadí i některá další zánětlivá střevní onemocnění (jako například mikroskopická kolitida),⁷ těmi se však tato práce nezabývá.

Idiopatický střevní zánět a primární sklerózující cholangitida

Primární sklerózující cholangitida (PSC) je vzácnou chorobou žlučového stromu, jejíž kauzální léčbu doposud představuje pouze transplantace jater (LTx). PSC postihuje zpravidla mladé pacienty (typicky muže mezi 30–40 lety věku), často již s osobní anamnézou autoimunitního onemocnění.⁸ Nemoc má výrazně progresivní charakter a vede k rozvoji jaterní cirhózy (včetně všech projevů portální hypertenze), rekurentní bakteriální sepsi, úpornému pruritu a dalším klinicky významným komplikacím výrazně snižujícím kvalitu života nemocných.^{9, 10} Ti jsou navíc zatíženi zvýšeným rizikem rozvoje hned několika nádorových onemocnění – cholangiocelulárního karcinomu, kolorektálního karcinomu, hepatocelulárního karcinomu a karcinomu žlučníku.¹¹

PSC je u většiny pacientů asociována s idiopatickým střevním zánětem, který se pro svá specifika vymezuje v současné době jako samostatný fenotyp IBD (tzv. PSC-IBD), odlišný od Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy.^{9, 12, 13} Klíčové patofyziologické

a klinické aspekty PSC a PSC-IBD (včetně vztahu k neoplaziím a transplantační léčbě) jsou detailně rozebrány v *Publikacích 1, 4, 5 a 6*.

Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů

Vyšetřovací metody v diagnostice (a diferenciální diagnostice) IBD zahrnují celou škálu klinických, laboratorních (včetně imunologických), radiodiagnostických, endoskopických a histopatologických metod. Algoritmy jejich používání v klinické praxi jsou velmi komplexní a u každého pacienta jsou voleny individuálně s ohledem na jeho celkový klinický stav a aktuální fázi choroby.^{14, 15}

Terapeutickou snahou u pacientů s IBD je zvolení vhodné „léčby na míru“ a při jejím výběru je třeba zhodnotit mnoho faktorů. Mezi ty patří rozsah a doba trvání choroby, její dosavadní klinický průběh, výskyt mimostřevních projevů, komorbidit, celkový stav pacienta, odpověď na předešlou léčbu a v neposlední řadě i preference samotného nemocného. Nejčastější modalit farmakologické terapie IBD zahrnují aminosalicyláty, kortikosteroidy a imunosupresiva (resp. imunomodulátory). Zásadní změnu v konzervativní terapii IBD přinesly, preparáty biologické léčby.^{15, 16}

Novou farmakologickou modalitou v současné klinické praxi jsou takzvané „malé molekuly“, reprezentované tofacitinibem (inhibitor Janusovy kinázy).¹⁷ Podstatné množství případů IBD (zejména pak CD) vyžaduje v průběhu trvání choroby léčbu chirurgickou, a to mnohdy opakovaně.^{16, 18}

Klinická péče o pacienty s IBD, včetně diagnostických a terapeutických postupů, tvoří velmi rozsáhlou oblast současné gastroenterologie a svou šíří překračuje rámec této práce, která se jimi zabývá pouze okrajově.

Patogeneze idiopatických střevních zánětů

Idiopatické střevní záněty jsou v současnosti jedněmi z nejvíce zkoumaných lidských chorob a stále podrobnější znalost patogenetických souvislostí přispěla v posledních 20 letech k výraznému posunu na poli terapie IBD. Navzdory tomu však nebyla etiopatogeneze IBD doposud plně objasněna.¹⁹ Dle současných poznatků je definována patologickou imunitní odpovědí proti určitým složkám střevní mikrobioty u geneticky predisponovaných jedinců. Vyjma role přirozené a adaptivní imunity, genetiky a střevního mikrobiomu se však v posledních letech daří stále detailněji odhalovat asociaci s ostatními faktory, obzvláště s různými vlivy prostředí, které mohou aberantní imunitní

odpověď iniciovat.²⁰ V současné době je trendem vědeckého výzkumu na poli IBD snaha o integraci jednotlivých poznatků a pochopení vzájemné interakce různých etiologických kofaktorů (tzv. „interaktom“).²⁰ Jednotlivé tématické oblasti známých faktorů podílejících se na patofyziologii IBD jsou popsány níže.

Genetická predispozice

Důležitost genetické predispozice dokládá fakt, že až 12 % pacientů s IBD má pozitivní rodinnou anamnézu pro stejný typ onemocnění. V případě Crohnovy choroby bylo u příbuzných prvního stupně prokázáno vyšší riziko rozvoje choroby než u ulcerózní kolitidy, což potvrzují i studie na monozygotních dvojčatech.^{21, 22}

Metodické pokroky v oblasti molekulární biologie a dostupnost obsáhlých mezinárodních databází umožnily v posledních desetiletích zásadní prohloubení evidence o podílu genetiky v etiopatogenezi IBD.^{1, 19, 23} Významným objevem na poli soudobého genetického výzkumu byl průkaz asociace genu *NOD2* (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, dříve známý jako CARD15) s CD. Tento náález nastínil provázanost genomu a mikrobiomu v patogenezi IBD: *NOD2* je spouštěčem imunitní odpovědi na podkladě rozpoznávání MDP (muramyl dipeptidu), peptidoglykanu obsaženého v buněčné stěně bakterií.²⁴ Asociace IBD a genu *NOD2* byla posléze potvrzena též na úrovni GWAS (genome-wide association studies) – přelomového nástroje v identifikaci genů provázaných s jednotlivými chorobami.²⁵ V roce 2006 byl pomocí GWAS identifikován další důležitý „IBD-gen“ pro receptor IL23R.²⁶ Klíčová role dráhy IL-23/T_H17 ve střevní homeostáze a obraně proti mikrobiálním patogenům byla potvrzena jak na myších modelech chemicky indukované kolitidy, tak přímo u pacientů s IBD.²⁷ Další studie postupně identifikovaly více než 230 alel asociovaných s IBD, z nichž je většina specifická pro oba základní fenotypy (CD a UC) zároveň. To naznačuje existenci patogenetických mechanismů, které jsou společné pro obě onemocnění. Velká část příslušných genů je zodpovědná za interakce hostitelského organismu s mikrobiotou.^{1, 28, 29} Bylo prokázáno, že pravděpodobnost rozvoje IBD roste s počtem rizikových alel u daného jedince. Fakt, že se zmíněné geny v 75 % případů IBD vůbec nevyskytují (literárně popisováno také jako tzv. „genetické vakuum“) však ukazuje, že se etiologie IBD zdaleka neomezuje pouze na genetickou predispozici, ale má komplexní multifaktoriální charakter.³⁰

Uvedené GWAS identifikovaly několik s IBD sdružených variant u genů, které kódují DNA-metyltransferázy.³¹ Například právě metylace DNA či modifikace histonových proteinů jsou spoluodpovědné za epigenetické změny genové exprese, které nejsou podmíněny nukleotidovou sekvencí DNA. Epigenetické modifikace genů zodpovědných za rozvoj zánětlivé odpovědi (např. prostřednictvím IgA či IL-23) mohou být iniciovány či ovlivňovány mikrobiotou a jí produkovanými metabolity (např. mastné kyseliny s krátkým řetězcem), a mít tak zásadní úlohu v patogenezi IBD.^{29, 32, 33}

Role mikrobioty

Střevní mikrobiota člověka obsahuje více jak tisíc, převážně anaerobních, bakteriálních druhů.³⁴ Minoritními komponenty střevní mikrobioty, které však mohou mít podstatný vliv na střevní homeostázu a vznik chorobných stavů, představují viry^{35, 36}, houby^{37, 38} či Archea.³⁹ K osídlení střeva mikrobiy dochází již v prvních týdnech života a jejich kompozice je za fyziologických podmínek v průběhu života relativně stabilní.³⁴ Složení střevní mikrobioty je pravděpodobně ovlivněno zatím ne zcela přesně definovanými dědičnými faktory. Rozsáhlé studie na dvojčatech například prokázaly významně homogennější kompozici u monozygotních dvojčat v porovnání s dizygotními.⁴⁰ Fyziologická střevní mikrobiální flóra má mimo jiné schopnost zabránit uchycení a proliferaci patogenů (tzv. kolonizační rezistence).⁴¹ Základním předpokladem správné maturace imunitního systému je vysoká míra mikrobiální diverzity. Snížená diverzita je naopak charakteristická pro dysbiózu, tedy stav definovaný narušením funkce či složení mikrobioty v dané nise. Jinými typickými znaky dysbiózy jsou úbytek benefičních mikrobů a expanze patobiontů – symbiotických mikrobů s patogenním potenciálem.⁴²⁻⁴⁴ Složení střevní mikrobioty může být výrazně modifikováno zevními vlivy. Tato vzájemná provázanost má prokazatelně významnou úlohu v patogenezi mnoha chorob včetně IBD, jejímž ústředním bodem je právě dysbióza. V tomto smyslu hrají důležitou úlohu zejména dieta, kouření, akutní infekční epizody a expozice xenobiotikům včetně antibiotik, nesteroidních antirevmatik a mnoha dalších farmak.^{45, 46}

Klíčové úloze mikrobioty v patogenezi IBD nasvědčuje predominance postižení v tkáních, které jsou mikrobům vysoce exponované; experimentální modely pak prokázaly utlumení či dokonce absenci zánětu v bezmikrobním prostředí.⁴⁷⁻⁴⁹ Relativní četnost konkrétních bakteriálních taxonů je u pacientů s IBD specificky zvýšená nebo snižena, avšak zatím se nepodařilo spolehlivě odpovědět na otázku, zda jde o příčinu, následek

(ev. obojí zároveň) anebo jen průvodní jev střevního zánětu. Některé bakterie vykazují v kontextu střevní inflamace agresivní (např. invazivní *Escherichia coli*), nebo naopak protektivní funkci a jejich vzájemný poměr tedy může být rozhodující v tom, jestli se zánět rozvine či nikoliv.

Probiotické vlastnosti jsou přisuzovány například některým butyrát-produkujícím bakteriím, jako jsou *Faecalibacterium prausnitzii* nebo *Roseburia hominis*.^{20, 50, 51} Prokázaná korelace četnosti druhu *Faecalibacterium prausnitzii* s genem *CNTN6* opět naznačuje potenciální vliv genetické výbavy na složení mikrobioty.⁵² Různé komponenty střevní mikrobioty se prokazatelně navzájem ovlivňují, a změna kompozice mikrobů u IBD se tak netýká pouze bakterií, ale také například virů a kvasinek.^{36, 38}

Užívání antibiotik, byť krátkodobé, prokazatelně narušuje kompozici střevního mikrobiomu. Složení mikrobioty se sice po ukončení léčby zpravidla navrácí do téměř výchozího stavu před léčbou v rámci několika týdnů, přesto se některá jednotlivá bakteriální taxa neobnoví ani po mnoha měsících, a antibiotika tak mohou zapříčinit dlouhodobou změnu střevní ekologie. Široká dostupnost antibiotik ve vyspělých zemích (a jejich zvyšující se dostupnost v zemích rozvojových) dobře koreluje s vysokou (resp. narůstající) incidencí IBD. Metaanalýza dostupných studií prokázala, že je (především opakovaně) užívání antibiotik s rizikem rozvoje IBD významně asociováno, obzvláště pak u pacientů s anamnézou frekventní antibiotické léčby v dětském věku.^{53, 54} Potenciál antibiotik (a/nebo probiotik) modulovat střevní mikrobiom je pochopitelně zkoumán i v souvislosti s terapií IBD.⁵⁵ Souhrn možností terapeutické manipulace s mikrobiotou je podrobně zpracován v **Publikaci 3**.

Porucha střevní bariéry

Střevní sliznice má obrovskou plochu (přibližně 400 m²), kde přichází střevní mikrobiota do kontaktu s prakticky největší „základnou“ imunitního systému v lidském organismu. Úlohou střevní bariéry je za fyziologických podmínek na jedné straně chránit organismus před průnikem mikrobiálních patogenů a toxinů, na straně druhé je zodpovědná za přestup potřebných živin a tekutin. Funkční aspekt těchto částečně protichůdných úloh lze označit jako střevní permeabilitu.^{56, 57}

Střevní bariéra je mimo hlenu, sekrečního IgA a mikrobiální složky tvořena především jednovrstevným epitelem obsahujícím různé druhy buněk: enterocyty a dále pohárkové buňky, Panethovy buňky a enteroendokrinní buňky. Součástí tohoto buněčného

komplexu jsou také buňky imunitního systému, zejména lymfocyty a dendritické buňky.⁵⁸
⁵⁹ Mechanická soudržnost buněčných elementů a regulace paracelulární permeability iontů a malých molekul je zajišťována především 3 typy buněčných spojení: zonulae occludentes (nebo též těsné spoje), zonulae adherentes (adhesní spoje) a desmosomy.^{60, 61}

Současná znalost patogenetických mechanismů u zánětlivých chorob střeva a jater definovala klíčovou úlohu střevní bariéry jak za fyziologických, tak i s nemocí sdružených podmínek. Alterace střevní permeability (a následná zvýšená stimulace imunitních buněk lumenálními antigeny) se dle současných poznatků zdá být krucálním bodem v patogenezi IBD⁶⁰ a některé literární zdroje dokonce IBD přímo označují za „Chorobu narušené střevní bariéry“.^{62, 63}

Střevní bariéra u pacientů s IBD totiž vykazuje zvýšenou střevní paracelulární permeabilitu;⁶⁴ alterace těsných mezibuněčných spojení byla prokázána hned několika studiemi^{65, 66}. Snížená exprese a redistribuce jejich stavebních molekul (např. okludiny, kladiny a JAM – junctional adhesion molecules) byla u IBD také podrobně dokumentována.⁶⁷⁻⁶⁹ Tyto nálezy jsou navíc podpořeny studií na myším modelu, která prokázala, že delece genu pro kladin-7 způsobuje zánět tračníku.⁷⁰ Narušení střevní bariéry je důsledkem zánětlivé odpovědi a zároveň samo o sobě primárním defektem podněcujícím další zánětlivou aktivitu.⁷¹ I ve fázi slizničního hojení je přímo zodpovědné za vznik s chorobou souvisejících symptomů (zejména průjem a abdominální bolest).⁷²

Role imunitní odpovědi

Imunologická homeostáza střeva je výsledkem komplexní reciproké regulace mezi mikrobiotou a hostitelskými (imunitními i neimunitními) buňkami. Přirozenou vlastností lidské imunity je selektivní tolerance vůči autologní střevní flóře. Ztráta této tolerance vede k rozvoji zánětlivých změn, což se zdá být při chronickém průběhu klíčovým mechanismem v rozvoji a aktivitě IBD.⁷³ Rozhodující roli v maturaci slizniční imunity hraje opět právě mikrobiota. Nejen T- a B-lymfocyty, ale též enterocyty, Panethovy buňky a dendritické buňky, naopak secernují solubilní faktory regulující kvalitativní i kvantitativní kompozici mikrobioty. Deregulace na kterékoliv úrovni může narušit fyziologickou rovnováhu, a být tak v konečném důsledku zodpovědná za rozvoj zánětlivé odpovědi.⁷⁴

Regulace hostitelské imunity je logickým cílem farmakologické léčby IBD, jelikož v rámci komplexní multifaktoriální etiopatogeneze představuje efektorovou složku kaskády, jejímž výsledkem jsou samotné zánětlivé změny.⁷⁵

Přesné mechanismy, jakými je patologická imunitní odpověď u IBD iniciována a udržována, nebyly doposud rozklíčovány. Navzdory tomu konkrétní vzorce T-buněčné imunitní reakce jsou u CD i UC relativně dobře popsány. UC je charakterizována atypickou T_H2 -odpovědí s nadprodukcí IL-5 a IL-13 a naopak nízkými hladinami IL-4. U CD pak převažuje odpověď zprostředkovaná T_H1 a T_H17 se zvýšenou produkcí IFN- γ , IL-12 a IL-17A. Právě IL-17A zároveň významně podněcuje slizniční bariérovou funkci v ochraně před mikrobiálními patogeny. Jeho absence vede k nedostatečné reakci neutrofilů proti mikrobům a další facilitaci střevního zánětu, jak dokazují i studie na myších modelech.^{59, 76-78}

Identifikace *NOD2*, *ATG16L1* a *IRGM*, genů významně asociovaných s IBD, prokázala zásadní roli autofagie v imunitní odpovědi spojené s rozvojem střevního zánětu. Znalost těchto mechanismů položila v rámci aplikovaného výzkumu základ pro vývoj moderních preparátů biologické léčby.^{19, 79-82}

Faktory zevního prostředí

Aktuální epidemiologická data naznačují, že faktory zevního prostředí mají v patogenezi IBD velmi zásadní vliv. Celosvětová „westernizace“ životního stylu patrně s prudkým nárůstem incidence IBD úzce souvisí.⁴⁵ To podporují i závěry populačních studií, demonstrující zvýšený výskyt IBD u potomků těch jedinců, kteří emigrovali ze zemí s nízkým výskytem IBD do zemí s výskytem vysokým.⁸³ Zlepšení celkových sanitárních podmínek, a s tím související pokles výskytu infekčních chorob ve vyspělých zemích, může dle tzv. „Hygienické hypotézy“ taktéž s narůstající incidencí IBD souviset. Jak již bylo naznačeno výše, některé faktory zevního prostředí souvisejí s patogenezí IBD zejména skrze modulaci střevní mikrobioty. Nejvíce přesvědčivá evidence existuje pro roli diety, kouření a užívání některých farmak (mimo antibiotik například kontraceptiva či nesteroidní antirevmatika). Další literárně popsané faktory představují appendektomie, deficit vitamínu D, stres, socioekonomický status či znečištění ovzduší.^{20, 84-89}

Vztah idiopatických střevních zánětů ke kolorektálním neoplaziím

Asociace IBD s vysokým výskytem kolorektálních neoplazií je literárně jednoznačně doložena a v klinické praxi diktuje zejména specifické screeningové algoritmy.^{14, 15} Základním principem karcinogeneze u IBD je role chronického zánětu.⁹⁰ Přehled problematiky kolorektálních neoplazií u IBD z patofyziologického i klinického pohledu je zpracován v *Publikaci 7*.

Asociace idiopatických střevních zánětů s autoimunitní pankreatitidou

Pacienti s IBD mají oproti zdravé populaci významně vyšší riziko rozvoje mnoha imunitně zprostředkovaných chorob, včetně autoimunitních. Mezi ně patří například psoriáza, diabetes 1. typu, celiakie, autoimunitní hepatitida nebo astma.⁹¹

Další z takových chorob spojených s IBD je autoimunitní pankreatitida (AIP), resp. AIP 2. typu. Asociace AIP 2. typu a IBD byla popsána Notoharou v roce 2003 a oproti AIP 1. typu jsou pro ni typické snížené hladiny sérových hladin IgG4.^{92, 93} AIP 2. typu je relativně vzácnou diagnózou a vyskytuje se spíše u UC nežli CD. Dle studie z roku 2013 je 1-, 3- a 5-leté riziko rozvoje AIP u ulcerózní kolitidy 0,2 %, 0,6 % a 0,8 %. Naopak prevalence UC u pacientů s AIP činí v západních zemích až 35 %. Ve většině případů se u pacientů s těmito sdruženými chorobami projeví UC dříve nežli AIP. Při současném výskytu AIP má UC (někdy se stav označuje jako „AIP-UC“ nebo „AIP-IBD“) navíc tendenci k závažnějšímu klinickému průběhu.⁹⁴⁻⁹⁶

Chronická pankreatitida (ChP) je známým rizikovým faktorem karcinomu slinivky. Kumulativní riziko rozvoje karcinomu u ChP po 20 letech trvání choroby je odhadováno na 4 procenta. Mechanismus karcinogeneze ve vztahu k AIP však dosud nebyl definován.^{97, 98}

HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Hypotézy

- 1) PSC-IBD se v klíčových bodech patogeneze (složení střevní mikrobioty, porucha střevní bariéry, aberantní imunitní odpověď) odlišuje od ostatních fenotypů IBD.
- 2) PSC-IBD ovlivňuje prognózu jaterního štěpu po transplantaci jater pro PSC.
- 3) IBD a s nimi asociované choroby jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku neoplazií.

Hlavní cíle práce

- 1) Charakterizovat za použití sekvenačních metod nové generace (NGS) složení střevního mikrobiomu u pacientů s IBD.
- 2) Stanovit ve vybraných skupinách pacientů hladiny relevantních sérových markerů poruchy střevní bariéry.
- 3) Charakterizovat u jednotlivých fenotypů specifika humorální a buněčné odpovědi.

Vedlejší cíle práce

- 1) Pomocí širokospektrých proteinových arrayí stanovit sérové biomarkery asociované s různými fenotypy IBD.
- 2) Retrospektivně analyzovat soubor pacientů transplantovaných pro PSC se zaměřením na aktivitu střevního zánětu, výskyt neoplazií a prognózu jaterního štěpu.
- 3) Určit koincidenci autoimunitní pankreatitidy a karcinomu pankreatu u pacientů resekovaných pro fokální tumorózní pankreatickou masu.

PUBLIKACE 1

PSC-IBD: specifický fenotyp idiopatického střevního zánětu asociovaný s primární sklerózující cholangitidou

Lukáš Bajer, Pavel Wohl, Pavel Drastich

Klinika hepatogastroenterologie IKEM, Praha

Souhrn

Primární sklerózující cholangitida (PSC) je progresivní chorobou žlučových cest a ve vyspělých zemích představuje jednu z nejčastějších indikací ortotopické transplantace jater (OLTx), která je zároveň jedinou doposud známou kurativní metodou. U přibližně 70 % pacientů je PSC doprovázena idiopatickým střevním zánětem (IBD). Ten je pro svoje četná klinická a etiopatogenetická specifika považován za samostatný fenotyp IBD, odlišný od lépe definovaných chorob: ulcerózní kolitidy (UC) a Crohnovy choroby (CD). V literatuře bývá onemocnění obvykle označováno jako „PSC-IBD.“ Ve většině případů se manifestuje jako klinicky mírná extenzivní kolitida s pravostrannou predominancí. Dalšími se zvýšenou frekvencí zastoupenými morfologickými znaky jsou „back-wash“ ileitida a „rectal-sparing“. Pacienti s PSC-IBD jsou ohroženi vysokým rizikem vzniku kolorektálních neoplazií s tendencí k rychlé progresi. Pankoloskopické vyšetření s chromoendoskopií či etážovým odběrem biopsií musí být u této skupiny nemocných prováděno v intervalu 1–2 let. Již při nálezů nízkého stupně dysplazie musí být zváženo provedení profylaktické kolektomie. Farmakologická léčba PSC-IBD se řídí obdobnými algoritmy jako terapie UC a CD, má však svoje specifika, která zohledňují především souběžnou chorobu jater. Metodou volby v léčbě chirurgické je proktokolektomie s ileo-pouch-anální anastomózou (IPAA). Pacienti s PSC-IBD a IPAA vykazují zvýšené riziko rozvoje pouchitidy. Průběh střevního zánětu po OLTx se může navzdory podávané imunosupresi významně zhoršit. U mnoha pacientů dokonce choroba vzniká až de novo po OLTx a může ovlivňovat riziko rekurence PSC v jaterním štěpu.

Klíčová slova: idiopatický střevní zánět – primární sklerózující cholangitida – PSC-IBD

PSC-IBD: specific phenotype of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis

Summary

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a progressive disease of the biliary tree which represents one of the most frequent indications for orthotopic liver transplantation (OLTx) in developed countries. LTx is currently the only curative procedure for PSC. Concomitant inflammatory bowel disease (IBD) is present in approximately 70 % of patients with PSC. Such colitis in PSC has specific clinical and etiological features and is considered as a distinct phenotype of IBD often referred to as „PSC-IBD“. The phenotype usually manifests as mild extensive colitis with right-sided predominance. Other morphological features, such as back-wash ileitis and rectal sparing, are also increasingly prevalent in PSC-IBD. Moreover, patients with PSC-IBD have increased risk towards developing colorectal neoplasia which tend to be highly progressive. Therefore, total colonoscopy employing multiple random biopsies or chromoendoscopy should be performed every 1–2 years once PSC-IBD is diagnosed. Even detection of low-grade dysplasia in colonic mucosa should lead towards prophylactic colectomy consideration in patients with PSC-IBD. Recommendations regarding pharmacological therapy are based on the similar principles as in Crohn's disease and ulcerative colitis. However, status of the liver disease should always be taken into account. Proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis (IPAA) is a method of choice in the field of surgical therapy of PSC-IBD. The clinical course of PSC-IBD may deteriorate after OLTx despite immunosuppressive therapy administration. IBD can even develop de-novo after OLTx and may significantly influence the risk ratio for PSC recurrence in the liver graft.

Key words: inflammatory bowel disease – primary sclerosing cholangitis – PSC-IBD

Úvod

Primární sklerózující cholangitida je progresivní cholestatická choroba jater charakterizovaná zánětem, fibrozou a stenózami malých a/nebo velkých větví žlučového stromu. Onemocnění může vést až k jaterní cirhóze, transplantaci jater či úmrtí. V rámci Evropy má PSC nejvyšší incidenci v severovýchodních zemích (1,3/100 000 obyvatel/rok v Norsku), zatímco v jihovýchodních zemích je výskyt znatelně nižší (0,07/100 000 obyvatel/rok ve Španělsku). Téměř 2krát častěji se nemoc vyskytuje v mužské populaci [1–3]. Přesná data o výskytu v České republice k dispozici nejsou. Z bezmála 1 500 pacientů, kteří podstoupili transplantaci jater v pražském IKEM v letech 1995–2017, byl však přibližně každý 10. zařazen na čekací listinu právě z indikace pokročilé PSC.

U přibližně 70 % (dle různých studií 55–99 %) pacientů je PSC doprovázena idiopatickým střevním zánětem (inflammatory bowel disease – IBD) [4]. Tuto asociaci mezi onemocněními dvou různých orgánů zažívacího traktu popsal Warren již v roce 1966 [5]. Střevní zánět u PSC je v praxi ve více než 75 % případů kvalifikován jako ulcerózní kolitida (ulcerative colitis – UC), méně často pak jako Crohnova nemoc (Crohn's disease – CD). Typické histologické znaky CD jsou však vyjádřeny jen velmi vzácně, postižení je vázáno téměř výhradně na tlusté střevo (CD se může vyskytovat v jakékoli části trávicí trubice), a diagnóza tak často nakonec bývá překvalifikována na UC. Zejména starší literatura popisuje PSC jako extraintestinální (hepatobiliární) manifestaci IBD, především UC. Tato definice ale může být zavádějící, jelikož se PSC u přibližně poloviny pacientů vyvíjí často i mnoho let před IBD, v jiných případech naopak vzniká dlouho po provedení proktokolektomie [6–8].

Střevní zánět doprovázející PSC vykazuje četná patogenetická, morfologická a klinická specifika (tab). Genetický podklad je v porovnání s „klasickými“ fenotypy IBD (UC a CD) taktéž odlišný. V současné době je tedy toto střevní onemocnění považováno za zcela samostatný fenotyp IBD. V literatuře se většinou označuje jako „PSC-IBD“, případně jako „PSC-UC“ nebo „PSC-CD“ (dle toho, kterému z klasických fenotypů IBD se u daných pacientů více podobá) [9–11].

Tab. Nejčastěji zastoupené klinické a morfologické rysy PSC-IBD

extenzivní kolitida (pankolitida) s pravostrannou predominancí
mírný či zcela klidový klinický průběh
back-wash ileitida
rectal-sparing
vysoké riziko vzniku kolorektálních neoplazií
zvýšený výskyt pouchitidy u pacientů po proktokolektomii s IPAA
zvýšené riziko krvácení z peristomálních varixů u pacientů s ileostomií

IPAA – ileo-pouch-anální anastomóza/Ileal Pouch-Anal Anastomosis

Klinický obraz PSC a IBD

Diagnostika a klinický průběh PSC

V období předcházejícím rozmach moderních zobrazovacích a endoskopických metod byla PSC považována za zcela raritní onemocnění. Záchyt PSC však významně vzrostl s nástupem ERCP (endoskopická retrogradní cholangiopankreatografie) v 70. letech minulého století a posléze MRCP (magnetická rezonanční cholangiopankreatografie/Magnetic Resonance Cholangiopancreatography) v 90. letech minulého století. V dnešní době je ERCP rezervována pro terapeutické účely a jako čistě diagnostický nástroj je preferována MRCP (obr. 1) [12]. Normální nálezy na cholangiogramu však s jistotou nevyklučují diagnózu PSC, tzv. „small-duct“ forma, tedy onemocnění malých žlučovýchodů, je totiž detekovatelná pouze na základě jaterní biopsie. Změny navíc mohou být vyjádřeny fokálně, a ani histologické vyšetření punktátu tak nemusí změny na drobných žlučovodech vždy zachytit [13]. V přibližně 10–20 % případů PSC koinciduje s autoimunitní hepatitidou (AIH). Tento stav, dříve označovaný jako „overlap-syndrome AIH/PSC“, má svoje diagnostická a léčebná specifika, z větší části diktovaná autoimunitní složkou choroby [14,15].

Tiže projevů spojených s PSC je variabilní, pohybující se od asymptomatické elevace ALP až k významnému ikteru, refrakternímu pruritu, cholangiogenní sepsi a plné paletě symptomů vyplývajících z jaterní dysfunkce a pokročilé portální hypertenze. Zmíněné těžké projevy choroby, vedoucí k nutnosti transplantace nebo až k úmrtí, nastupují však zpravidla po mnoha letech jejího trvání [12,15].

Morfologie a aktivita PSC-IBD

PSC-IBD se v až 95 % případů manifestuje jako pankolitida. V rámci tohoto extenzivního postižení tračníku bývají mor-

Obr. 1. Cholangiogram u pacienta s PSC. Typické změny zachycené při MRCP: vícečetné segmentální striktury a dilatace žlučového stromu s charakteristickým „korálkováním“



fologické změny často nejvíce vyjádřeny v pravostranném kolon (obr. 2). Někdy dokonce hovoříme o „pravostranné kolitidě“, což odlišuje tento fenotyp IBD od ulcerózní kolitidy. U té rozsah zánětu tradičně sleduje osu proktitida → levostranná kolitida → pankolitida, přičemž nejvýznamnější změny nacházíme zpravidla v rektu (a k posouzení aktivity zánětu tak mnohdy postačí sigmoidoskopie). U PSC-IBD bývá rektum naopak se zvýšenou frekvencí (u přibližně jedné třetiny pacientů) intaktní, hovoříme pak o tzv. rectal-sparingu. Dalším častěji zastoupeným morfolickým znakem PSC-IBD bývá „backwash-ileitida“, tedy reaktivní zánětlivé postižení terminálního ilea doprovázející inflamaci céka. Tento nález bývá přítomen v asi v 17 % případů.

Navzdory vysoké prevalenci pankolitidy mívá PSC-IBD zpravidla mírný klinický průběh. Typické symptomy IBD (především průjemy, tenezmy, krvavá příměs ve stolici atp) buď zcela chybějí, nebo bývají ve většině případů taktéž relativně mírné. Relapsy choroby a nutnost kortikoterapie či hospitalizace nebývají u této skupiny pacientů s IBD obvyklé. Přesto může mít u části pacientů PSC-IBD refrakterní průběh, vyžadující nasazení agresivní farmakoterapie, nebo dokonce provedení proktokolektomie [10,11,14,16,17].

Obr. 2. Endoskopický nález u PSC-IBD: extenzivní kolitida s pravostrannou predominancí zánětlivých změn. Aktivní zánět v céku (nahore) s úbytkem inflamatorních změn distálním směrem (dole)



Specifika endoskopie a kolorektální neoplazie u PSC-IBD

Vzhledem k pravostranné predominanci a častému ušetření rekta by se endoskopie u pacientů s PSC neměla nikdy omezovat na sigmoidoskopické vyšetření. Protože nemusejí být zánětlivé změny při typicky mírném průběhu choroby vyjádřeny makroskopicky, je za účelem vyloučení PSC-IBD vždy nutné doplnit pankoloskopické vyšetření o biopsii ze všech anatomických částí tlustého střeva (cékum až rektum). U pacientů s PSC bez průkazu IBD lze při absenci symptomů za racionální interval pro zopakování koloskopie považovat 3–5 let [11].

Potvrzení diagnózy PSC-IBD bez ohledu na aktivitu zánětu a věk pacienta naopak implikuje pravidelné protokolární koloskopické vyšetření v intervalu 1–2 let [17]. Důvodem je vysoký výskyt kolorektálních (navíc často rychle progredujících) neoplazií u PSC-IBD. Kumulační riziko vzniku kolorektálního karcinomu (Colorectal Cancer – CRC) do 10 a 20 let od stanovení diagnózy je 7–14 % a 18–31 %. U UC jsou pro ilustraci tyto hodnoty podstatně nižší: 2 % a 7 %, byť i zde je oproti běžné populaci riziko významně zvýšeno [18–20]. Neoplazie u PSC-IBD postihují ve více než 60 % případů pravostranné kolon, a provedení neodůvodněně inkompletní koloskopie je proto opět hrubou chybou [10,21]. Dle doporučení ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) je preferováno vyšetření za použití chromoendoskopie (metoda využívající tkáňová barviva) s následnou cílenou biopsií suspektních úseků sliznice. Alternativou je koloskopie s etážovým odběrem kvadrantových biopsií (tzv. „random-biopsy“) každých 10 cm, doplněná o cílené biopsie všech suspektních strukturálních změn [17]. Již nález nízkého stupně dysplazie (low-grade – LGD) by měl vést k vážné úvaze o provedení profylaktické proktokolektomie (netýká se kompletně odstranitelných polypoidních lézí). Sleté riziko progresu LGD do vysokého stupně dysplazie (high-grade – HGD), nebo dokonce adenokarcinomu v tomto případě totiž dosahuje 33–54 %. Nález HGD by pak měl být k profylaktické proktokolektomii referován vždycky [22–24].

Léčba PSC-IBD a její specifika Farmakoterapie u PSC-IBD

Medikamentózní terapie PSC-IBD se v zásadě řídí doporučeními platnými pro UC a CD, ovšem je při ní třeba pečlivě zohledňovat její dopad na průběh základní jaterní choroby [15]. Základním farmakem v terapii PSC-IBD je mesalazin. Vzhledem k většinou mírnému průběhu PSC-IBD postačuje mesalazin v monoterapii dlouhodobě u až 77 % pacientů. Navíc se předpokládá jeho chemopreventivní úloha v prevenci CRC [6,25]. Kortikosteroidy jsou k chronické udržovací terapii nevhodné a s ohledem na nízkou frekvenci relapsů u PSC-IBD není jejich užívání časté. U nemocných s PSC je k užití steroidů třeba přistupovat obezřetně vzhledem k riziku infekčních komplikací (cholangiogenní sepse) a zhoršení kostní choroby, která je v různé intenzitě přítomna u většiny pacientů s PSC [15,26]. Taktéž léčba

imunosupresivy musí probíhat se zvýšenou opatrností. Známy hepatotoxický účinek azatioprinu může být u PSC-IBD až 10krát větší než u pacientů s UC. Jeho nasazení by vždy mělo předcházet vyšetření TPMT (thiopurin methyltransferáza). Léčba kortikoidy a imunosupresivy nicméně má své nezastupitelné místo u pacientů s překryvným syndromem AIH/PSC [15,27]. S podáváním biologické léčby u PSC-IBD je stále poměrně málo zkušeností. Terapie anti-TNF (tumor necrosis factor) preparáty (zejména infliximab a adalimumab) se jeví jako účinná, její vliv na průběh souběžné jaterní choroby však zatím není spolehlivě definován. Obzvláště léčba infliximabem může být vzácně spojena s těžkou hepatotoxicitou, a k její indikaci u PSC-IBD je tak třeba přistupovat s opatrností [6,28]. Vzhledem k provázaným patogenetickým mechanismům PSC a IBD vzbudil velká očekávání vedolizumab, do klinické praxe recentně zavedená monoklonální antiintegrinová (anti- $\alpha 4\beta 7$) protilátka. Dle aktuální multicentrické studie je vedolizumab bezpečnou a efektivní léčebnou modalitou u PSC-IBD (včetně pacientů po OLTx), jeho podávání však nevede k poklesu jaterních testů [29].

Role kyseliny ursodeoxycholové (UDCA) v prevenci vzniku a progresi kolorektálních neoplazií u PSC je stále předmětem diskuse a závěry různých studií se v tomto ohledu rozcházejí. Evropské odborné společnosti však pro možný chemopreventivní účinek UDCA její podávání u PSC-IBD doporučují. Optimální dávkování v této indikaci se pohybuje mezi 8–15 mg/kg/den, dávky vyšší mohou být naopak spojeny se zvýšeným rizikem vzniku CRC a rozvojem závažných nežádoucích účinků. Při léčbě samotné PSC byl prokázán efekt UDCA na zlepšení laboratorních parametrů, nikoliv však na tíži symptomů nebo výslednou dobu přežití [30–34].

Chirurgická léčba u PSC-IBD

Chirurgická léčba bývá u PSC-IBD obvykle indikována při refrakterním průběhu kolitidy nebo při detekci dysplazií a její načasování musí striktně zohledňovat stav přidruženého onemocnění jater. Metodou volby je ve většině případů proktokolektomie s IPAA [35]. Výkon zahrnující zhotovení ileostomie s sebou při pokročilém jaterním onemocnění nese riziko vzniku peristomálních varixů, které mohou být příčinou velmi těžko zvladatelného krvácení [36]. Ileorektální anastomóza se u PSC-IBD nepoužívá.

Nejčastější komplikací IPAA je pouchitida. Vyskytuje se u přibližně 60 % pacientů s PSC-IBD po IPAA. To je asi 2krát častěji v porovnání s pacienty s UC. Selhání pouche (typicky z důvodu refrakterní pouchitidy, neoplazie nebo zformování píštěle) se vyskytuje v 1,5–16,1 % případů, což zhruba odpovídá frekvenci u ostatních fenotypů IBD [37–39].

Transplantační léčba ve vztahu k PSC-IBD

Ortotopická transplantace jater (OLTx) je dodnes jedinou kurativní modalitou u PSC. Zejména v severních zemích Evropy a Ameriky, v nichž má choroba nejvyšší

incidenci, je PSC jednou z nejčastějších indikací k OLTx. Vzhledem k progresivnímu charakteru choroby podstoupí OLTx do 10–20 let od stanovení diagnózy PSC více než 50 % pacientů [40]. Současná data naznačují, že tíže jaterní a střevní choroby mohou být do jisté míry protichůdné. Těžký průběh PSC vyžadující transplantaci jater je totiž většinou spojen s mírným průběhem IBD. Naopak u pacientů se stabilně málo pokročilou PSC byla pozorována tendence k vysoké aktivitě střevního zánětu [10,41]. Transplantace jater (a následně trvalé užívání imunosuprese) může být paradoxně spojena se zhoršením klinického průběhu IBD [42]. V až 31,3 % případů může navíc IBD vzniknout de novo po OLTx. Právě doba vzniku a aktivita IBD může mít zásadní vliv na riziko vzniku rekurence PSC po transplantaci (rPSC), a tím pádem i na přežití pacienta či jaterního štěpu [43]. Není proto s podivem, že je frekvence rPSC významně snižena u pacientů, kteří před transplantací prodělali kolektomii [44].

Závěr

PSC-IBD je dnes považován za samostatný fenotyp IBD, odlišný od UC a CD. Obvykle se projevuje jako klinicky mírná pankolitida. Onemocnění se vyznačuje vysokým výskytem a rychlou progresí kolorektálních neoplazií. Již při zachytu (nepolypoidní) LGD by proto měla být zvážena profylaktická kolektomie. Zánětlivé i neoplastické změny mají pravostrannou predominanci, kontrolní endoskopické vyšetření tedy musí probíhat v plném rozsahu tlustého střeva, a to v intervalu 1–2 let. K navození a udržení remise stačí u většiny pacientů PSC-IBD podávání mesalazinu. V chirurgické léčbě PSC-IBD je preferována proktokolektomie s IPAA. Při léčbě střevního zánětu u PSC je nutné kvalifikované zohlednění stavu přidruženého onemocnění jater.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-28064A.

Literatura

1. Schrupf E, Abdelnoor M, Fausa O et al. Risk factors in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1994; 21(6): 1061–1066.
2. Escorsell A, Pares A, Rodes J et al. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis in Spain. Spanish Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 1994; 21(5): 787–791.
3. Molodecky NA, Kareemi H, Parab R et al. Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2011; 53(5): 1590–1599. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/hep.24247>>.
4. Alipour M, Zaidi D, Valcheva R et al. Mucosal Barrier Depletion and Loss of Bacterial Diversity are Primary Abnormalities in Paediatric Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* 2016; 10(4): 462–471. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv223>>.
5. Warren KW, Athanassiades S, Monge JJ. Primary sclerosing cholangitis. A study of forty-two cases. *Am J Surg* 1966; 111(1): 23–38.
6. Rojas-Feria M, Castro M, Suarez E et al. Hepatobiliary manifestations in inflammatory bowel disease: the gut, the drugs and the liver. *World J Gastroenterol* 2013; 19(42): 7327–7340. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7327>>.
7. Schaeffer DF, Win LL, Hafezi-Bakhtiari S et al. The phenotypic expression of inflammatory bowel disease in patients with primary

- sclerosing cholangitis differs in the distribution of colitis. *Dig Dis Sci* 2013; 58(9): 2608–2614. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10620-013-2697-7>>.
8. Sinakos E, Samuel S, Enders F et al. Inflammatory bowel disease in primary sclerosing cholangitis: a robust yet changing relationship. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19(5): 1004–1009. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0b013e3182802893>>.
 9. Bajer L, Kverka M, Kostovcik M et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2017; 23(25): 4548–4558. <<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i25.4548>>.
 10. de Vries AB, Janse M, Blokzijl H et al. Distinctive inflammatory bowel disease phenotype in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2015; 21(6): 1956–1971. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i6.1956>>.
 11. Loftus EV Jr, Harewood GC, Loftus CG et al. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2005; 54(1): 91–96. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/gut.2004.046615>>.
 12. Williamson KD, Chapman RW. Primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis* 2014; 32(4): 438–445. <<http://dx.doi.org/10.1159/000358150>>.
 13. Naess S, Björnsson E, Ammarkrud JA et al. Small duct primary sclerosing cholangitis without inflammatory bowel disease is genetically different from large duct disease. *Liver Int* 2014; 34(10): 1488–1495. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/liv.12492>>.
 14. Williamson KD, Chapman RW. Primary sclerosing cholangitis: a clinical update. *Br Med Bull* 2015; 114(1): 53–64. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldv019>>.
 15. Chapman R, Fevery J, Kalloo A et al. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2010; 51(2): 660–678. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/hep.23294>>.
 16. Palmela C, Peerani F, Castaneda D et al. Inflammatory Bowel Disease and Primary Sclerosing Cholangitis: A Review of the Phenotype and Associated Specific Features. *Gut Liver* 2018; 12(1): 17–29. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.5009/gnl16510>>.
 17. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileal-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis* 2017; 11(6): 649–670. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx008>>.
 18. Fevery J, Henckaerts L, Van Oirbeek R et al. Malignancies and mortality in 200 patients with primary sclerosing cholangitis: a long-term single-centre study. *Liver Int* 2012; 32(2): 214–222. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02575.x>>.
 19. Claessen MM, Vleggaar FP, Tytgat KM et al. High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2009; 50(1): 158–164. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.013>>.
 20. Terg R, Sambuelli A, Coronel E et al. Prevalence of primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis and the risk of developing malignancies. A large prospective study. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2008; 38(1): 26–33.
 21. Broome U, Loffberg R, Veress B et al. Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: evidence for increased neoplastic potential. *Hepatology* 1995; 22(5): 1404–1408.
 22. Ullman TA, Loftus EV Jr, Kakar S et al. The fate of low grade dysplasia in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(4): 922–927. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05610.x>>.
 23. Connell WR, Lennard-Jones JE, Williams CB et al. Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; 107(4): 934–944.
 24. Zisman TL, Rubin DT. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14(17): 2662–2669.
 25. Stolfi C, Pallone F, Monteleone G. Colorectal cancer chemoprevention by mesalazine and its derivatives. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 980458. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/980458>>.
 26. Angulo P, Batts KP, Jorgensen RA et al. Oral budesonide in the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(9): 2333–2337. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.02323.x>>.
 27. Pallavicino F, Pellicano R, Reggiani S et al. Inflammatory bowel diseases and primary sclerosing cholangitis: hepatic and pancreatic side effects due to azathioprine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17(1): 84–87.
 28. Ghabril M, Bonkovsky HL, Kum C et al. Liver injury from tumor necrosis factor-alpha antagonists: analysis of thirty-four cases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11(5): 558–564. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2012.12.025>>.
 29. Christensen B, Micic D, Gibson PR et al. Vedolizumab in patients with concurrent primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease does not improve liver biochemistry but is safe and effective for the bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2018; 47(6): 753–762. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/apt.14525>>.
 30. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis* 2013; 7(1): 1–33. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2012.09.005>>.
 31. [European Association for the Study of the Liver]. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009; 51(2): 237–267. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2009.04.009>>.
 32. Lindor KD. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336(10): 691–695. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199703063361003>>.
 33. Wang R, Leong RW. Primary sclerosing cholangitis as an independent risk factor for colorectal cancer in the context of inflammatory bowel disease: a review of the literature. *World J Gastroenterol* 2014; 20(27): 8783–8789. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i27.8783>>.
 34. Singh S, Khanna S, Pardi DS et al. Effect of ursodeoxycholic acid use on the risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19(8): 1631–1638. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0b013e318286fa61>>.
 35. Treprasertsuk S, Björnsson E, Sinakos E et al. Outcome of patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis undergoing colectomy. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2013; 4(3): 61–68. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4292/wjgpt.v4.i3.61>>.
 36. Wiesner RH, LaRusso NF, Dozois RR et al. Peristomal varices after proctocolectomy in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1986; 90(2): 316–322.
 37. Mathis KL, Benavente-Chenhalls LA, Dozois EJ et al. Short- and long-term surgical outcomes in patients undergoing proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis in the setting of primary sclerosing cholangitis. *Dis Colon Rectum* 2011; 54(7): 787–792. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/DCR.0b013e318217eea7>>.
 38. Block M, Jorgensen KK, Oresland T et al. Colectomy for patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis – what next? *J Crohns Colitis* 2014; 8(5): 421–430. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2013.10.008>>.
 39. Gorgun E, Remzi FH, Manilich E et al. Surgical outcome in patients with primary sclerosing cholangitis undergoing ileal pouch-anal anastomosis: a case-control study. *Surgery* 2005; 138(4): 631–637; discussion 637–639. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2005.07.014>>.
 40. Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD et al. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 2013; 382(9904): 1587–1599. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60096-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60096-3)>.
 41. Marelli L, Xirouchakis E, Kalambokis G et al. Does the severity of primary sclerosing cholangitis influence the clinical course of associated ulcerative colitis? *Gut* 2011; 60(9): 1224–1228. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/gut.2010.235408>>.
 42. Moncrief KJ, Savu A, Ma MM et al. The natural history of inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis after liver transplantation – a single-centre experience. *Can J Gastroenterol* 2010; 24(1): 40–46.

43. Hildebrand T, Pannicke N, Dechene A et al. Biliary strictures and recurrence after liver transplantation for primary sclerosing cholangitis: A retrospective multicenter analysis. *Liver Transpl* 2016; 22(1): 42–52. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/lt.24350>>.

44. Lindstrom L, Jorgensen KK, Boberg KM et al. Risk factors and prognosis for recurrent primary sclerosing cholangitis after liver transplantation: a Nordic Multicentre Study. *Scand J Gastroenterol* 2018; 53(3): 297–304. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1080/00365521.2017.1421705>>.

MUDr. Lukáš Bajer

✉ lukas.bajer@ikem.cz

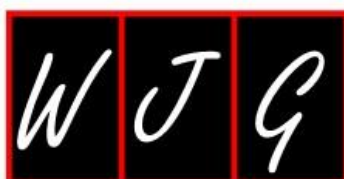
Klinika hepatogastroenterologie IKEM, Praha

www.ikem.cz

Doručeno do redakce: 23. 2. 2018

Přijato po recenzi: 18. 4. 2018

PUBLIKACE 2



Basic Study

Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis

Lukas Bajer, Miloslav Kverka, Martin Kostovcik, Peter Macinga, Jiri Dvorak, Zuzana Stehlikova, Jan Brezina, Pavel Wohl, Julius Spicak, Pavel Drastich

Lukas Bajer, Peter Macinga, Jan Brezina, Pavel Wohl, Julius Spicak, Pavel Drastich, Department of Gastroenterology and Hepatology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 14021 Prague, Czech Republic

Miloslav Kverka, Jiri Dvorak, Zuzana Stehlikova, Institute of Microbiology, the Czech Academy of Sciences, 14220 Prague, Czech Republic

Miloslav Kverka, Institute of Experimental Medicine, the Czech Academy of Sciences, 14220 Prague, Czech Republic

Martin Kostovcik, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, 12844 Prague, Czech Republic

Martin Kostovcik, BIOCEV, Institute of Microbiology, the Czech Academy of Sciences, 25242 Vestec, Czech Republic

Author contributions: Bajer L, Kverka M and Drastich P wrote the paper; Bajer L, Dvorak J and Stehlikova Z performed the experiments; Kverka M designed the research; Bajer L and Kostovcik M analyzed the data; Kostovcik M reviewed statistical methods; Macinga P and Brezina J recruited patients; Wohl P assessed clinical data; Spicak J and Drastich P supervised the research and revised the report; all authors contributed to this manuscript.

Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, No. 15-28064A.

Institutional review board statement: This study was approved by The Ethics Committee with multicenter competence of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital.

Informed consent statement: All patients and healthy controls signed the informed consent form at the time of sample collection.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Data sharing statement: Data sharing agreement was not included in the informed consent signed by the participants. The dataset supporting the conclusions of this article is available in the Short Read Archive repository. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/368966>.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Correspondence to: Pavel Drastich, MD, PhD, Associate Professor, Department of Gastroenterology and Hepatology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnka 1958/9, 14021 Prague, Czech Republic. pavel.drastich@ikem.cz
Telephone: +420-2-61362266
Fax: +420-2-61362615

Received: January 26, 2017
Peer-review started: February 3, 2017
First decision: March 16, 2017
Revised: April 10, 2017
Accepted: June 1, 2017
Article in press: June 1, 2017
Published online: July 7, 2017

Abstract

AIM

To characterize the gut bacterial microbiota of patients with primary sclerosing cholangitis (PSC) and ulcerative colitis (UC).

METHODS

Stool samples were collected and relevant clinical data obtained from 106 study participants, 43 PSC patients with ($n = 32$) or without ($n = 11$) concomitant inflammatory bowel disease, 32 UC patients, and 31 healthy controls. The V3 and V4 regions of the 16S ribosomal RNA gene were sequenced on Illumina MiSeq platform to cover low taxonomic levels. Data were further processed in QIIME employing MaAsLin and LefSe tools for analysis of the output data.

RESULTS

Microbial profiles in both PSC and UC were characterized by low bacterial diversity and significant change in global microbial composition. *Rothia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, and three other genera were markedly overrepresented in PSC regardless of concomitant inflammatory bowel disease (IBD). *Rothia*, *Veillonella* and *Streptococcus* were tracked to the species level to identify *Rothia mucilaginosa*, *Streptococcus infantus*, *S. alactolyticus*, and *S. equi* along with *Veillonella parvula* and *V. dispar*. PSC was further characterized by decreased abundance of *Adlercreutzia equolifaciens* and *Prevotella copri*. Decrease in genus *Phascolarctobacterium* was linked to presence of colonic inflammation regardless of IBD phenotype. *Akkermansia muciniphila*, *Butyrivibrio* *pullicaeorum* and *Clostridium colinum* were decreased in UC along with genus *Roseburia*. Low levels of serum albumin were significantly correlated with enrichment of order Actinomycetales.

CONCLUSION

PSC is associated with specific gut microbes independently of concomitant IBD and several bacterial taxa clearly distinguish IBD phenotypes (PSC-IBD and UC).

Key words: Dysbiosis; Inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Gut microbiota; Primary sclerosing cholangitis

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: This study demonstrates specific microbial patterns associated with PSC and/or concomitant inflammatory bowel disease (PSC-IBD). Several bacterial taxa convincingly distinguish PSC-IBD from ulcerative colitis. Gut microbiota composition also differs in patients with PSC overlap with autoimmune hepatitis. Disease-specific microbial features traceable down to the species level may lead to establishing suitable biomarkers or outlining new research directions in the field of PSC and IBD pathogenesis.

Bajer L, Kverka M, Kostovcik M, Macinga P, Dvorak J, Stehlikova Z, Brezina J, Wohl P, Spicak J, Drastich P. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2017;

23(25): 4548-4558 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i25/4548.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i25.4548>

INTRODUCTION

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic liver disorder of unknown etiology, characterized by inflammation and stenosis of the bile ducts^[1,2]. The disease may progress to severe liver fibrosis and subsequent liver cirrhosis, and may eventually lead to liver failure and death^[3]. Orthotopic liver transplantation (OLT) is the only currently available effective treatment for end-stage liver disease^[4]. Inflammatory bowel disease (IBD) is present in 60% to 80% of patients with PSC^[5]. Concomitant colonic disease is often classified as ulcerative colitis (UC)^[6], but is also considered to be a distinct phenotype and referred to as "PSC-IBD"^[7].

The involvement of gut bacteria in IBD is widely accepted, but the etiology and pathogenesis of IBD is still not fully understood. It is generally assumed that the inflammation results from an aberrant immune response to antigens of gut microbiota resident in genetically susceptible individuals^[8]. It has been proposed that either an imbalance of the intestinal microbiota (dysbiosis), or presence of commensal bacteria with increased virulence could promote exaggerated local and systemic immune responses by disrupting microbiota-mucosa interactions^[9,10].

Evidence from animal models^[11] and success of antibiotic treatment in PSC patients^[12] suggest that disruption of gut microbiota may play a significant role in pathogenesis of PSC. Recently, several studies described specific changes in the gut microbiota of PSC patients that were not related to dysbiosis with concomitant IBD^[13-20]. However, those studies differed in sampling, experimental methods and design, in addition to outcome.

The aim of this study was to identify microbial features specific to patients with PSC (with and without concomitant IBD), in an independent, well-characterized cohort, to compare them with healthy controls (HC) and patients with UC, and to verify previous findings.

MATERIALS AND METHODS

Study participants

PSC, PSC-IBD, and UC patients for this single center, cross-sectional study were recruited at the outpatient department of the Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague. Healthy controls (HCs) were age and sex matched volunteers with insignificant medical history that were randomly selected from the hospital patient database. HCs were eligible if they had no history of malignant or autoimmune disease, major abdominal surgery, gastrointestinal disease or chronic gastrointestinal symptoms. Anyone, healthy or

diseased, with antibiotic use within the previous 3 mo, a history of colorectal surgery, or ongoing or recent infectious colitis were excluded. Patients who received liver transplants were excluded because we assumed that OLT and related medications, immunosuppressive therapy in particular, might significantly influence the microbiota composition, and therefore cause substantial bias. To exclude the potential impact of obesity or malnutrition, only patients and controls with a normal BMI were recruited.

Sample collection, DNA extraction and amplification

Stool samples were freshly collected in standardized, sterile collection tubes by participants and brought to the clinic when they made their routine clinic visits. All samples were delivered within 6 h of collection, immediately frozen at -20 °C and within 2 wk transferred to a -80 °C freezer for long-term storage. Care was taken to prevent thawing until samples were suspended in extraction buffer^[21,22]. A MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre) was used for DNA extraction using a FastPrep®-24 Instrument homogenizer and Lysing Matrix Y zirconium oxide spheres (both MP Biomedicals). DNA concentration was equalized in each sample after quantitation with a Qubit™ 2.0 Fluorometer and a dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies). KAPA 2G Robust Hot Start DNA Polymerase (Kapa Biosystems) was used to amplify segments of the 16S rRNA gene including the V3 and V4 regions using 341F and 806R primers^[23]. The PCR protocol was initialized with 94 °C for 3 min, followed by 25 cycles of denaturation (94 °C, 30 s), annealing (54.2 °C, 1 min) and extension (72 °C, 1 min and 15 s), with the final extension (72 °C) for 10 min. The PCR products were purified and normalized for concentration with SequalPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher Scientific).

Library preparation and sequencing

After pooling, sample ligation was performed with a TruSeq DNA PCR-free LT Sample Preparation Kit (Illumina) following the standard protocol provided by the manufacturer. The libraries were validated by a KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems) prior to submission to The Genomics Core Facility, Central European Institute of Technology (CEITEC; Brno, Czech Republic) for sequencing on a MiSeq Platform (Illumina) using a Miseq Reagent Kit v3 (Illumina).

Data processing and quality control

Sequencing data were processed using a QIIME package^[24]. Briefly, raw reads were demultiplexed and quality filtered, allowing no N characters, a maximum of three consecutive low-quality base calls, a maximum unacceptable Phred quality of Q20, and a maximum of 1.5 barcode errors. Chimeric reads were detected and discarded using USEARCH algorithms^[25]. In the final dataset, the median of number of reads per sample reached 42459 sequences. Community statistics and

sample comparisons were done on resampled datasets at the level of 16400 sequences. This led to the exclusion of two samples, one from the PSC and one from the HC group because of an insufficient number of reads.

Statistical analysis and bioinformatics

The appropriateness of sequencing depth was checked in rarefaction plots. Alpha diversity statistics were calculated in QIIME^[24] using Shannon, Simpson, and observed species diversity indices, and the *P* value for group comparisons was determined by analysis of variance (ANOVA). Principal coordinate analysis plots were constructed to illustrate the beta diversity of samples based on phylogenetically informed weighted and unweighted Unifrac distance matrices^[26]. Significance of clustering patterns was tested by PERMANOVA, Adonis and ANOSIM in the R-vegan package. The multivariate homogeneity of group dispersions was assessed by Permdisp methods. Multivariate association with linear models (MaAsLin) for multivariate analysis^[27] applying an additive general linear model was used to assess the association between microbial abundance and patient metadata: Age, sex, gender, presence of PSC/AIH overlap, IBD activity, probiotic use (*E. coli* Nissle 1917), and use of anti-TNF treatment. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant after adjusting for false discovery rate (FDR). Raw demultiplexed sequencing data, with sample annotations, were submitted to the Short Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/368966>).

Ethical approval

This study was approved by The Ethics Committee with multicenter competence of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital. All patients and healthy controls signed the informed consent form at the time of sample collection.

RESULTS

Characteristics of the study population

A total of 106 individuals were enrolled, including 32 patients with PSC-IBD, 11 with PSC (without IBD), 32 with UC and 31 HCs. The diagnosis of PSC or PSC overlap with autoimmune hepatitis (PSC/AIH) syndrome was established following recommended biochemical, immunological, histological, and cholangiographic evaluation^[28-30]. The extent of UC was categorized endoscopically^[31] and Mayo classification^[32] was used to describe disease severity. All other patient characteristics were obtained on the day of sample collection (Table 1).

Decrease of microbial diversity is tightly linked to the presence of IBD

A decrease of alpha diversity in all patients compared

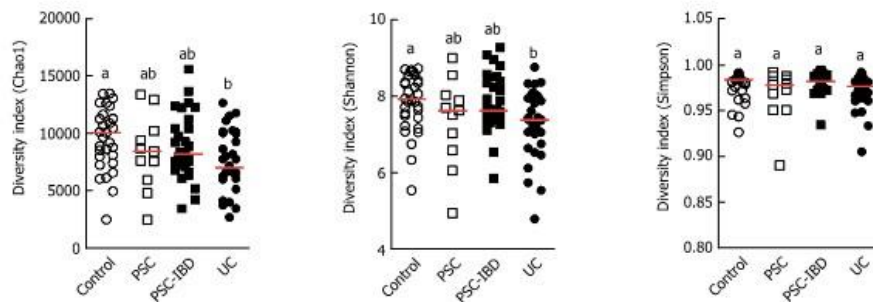


Figure 1 Alpha diversity was consistently reduced in patients with ulcerative colitis as determined by Chao1 index, Shannon index and Simpson index. Groups labeled by the same letter (a, b) on the graph are not significantly different from each other ($P < 0.05$) as analyzed by ANOVA with Tukey's post-hoc test.

Table 1 Demographical characteristics of the study population categorized by disease phenotype (and healthy controls) n (%)

	PSC-IBD ($n = 32$)	PSC ($n = 11$)	UC ($n = 32$)	Healthy controls ($n = 31$)
Gender; male/female	24/8 (75%/25%)	10/1 (90.9%/9.1%)	17/15 (53.1%/46.9%)	13/18 (41.9%/58.1%)
Median age (range), yr	35 (18-60)	45 (18-69)	40 (20-71)	44 (22-72)
Overlap syndrome PSC/AIH	6 (18.8)	2 (18.2)	N/A	N/A
Total bilirubin ($\mu\text{mol/L}$; mean \pm SD)	47 \pm 56.8	34.4 \pm 32.8	13.1 \pm 6.7	12.8 \pm 6.2
AST ($\mu\text{kat/L}$; mean \pm SD)	1.5 \pm 0.8	1.1 \pm 0.8	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3
ALT ($\mu\text{kat/L}$; mean \pm SD)	1.8 \pm 0.9	1.3 \pm 1.1	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.4
ALP ($\mu\text{kat/L}$; mean \pm SD)	7.4 \pm 5.7	4.3 \pm 4.9	1.1 \pm 0.4	1 \pm 0.3
GGT ($\mu\text{kat/L}$; mean \pm SD)	7.5 \pm 7.4	12.2 \pm 25.5	0.5 \pm 0.5	0.7 \pm 1.6
IBD extent:				
Pancolitis	28 (87.5)	N/A	25 (78.1)	N/A
Left-sided	0 (0)	N/A	7 (21.9)	N/A
Right sided	4 (12.5)	N/A	0 (0)	N/A
IBD activity:				
Mild or remission	24 (75)	N/A	20 (62.5)	N/A
Moderate	4 (12.5)	N/A	3 (9.4)	N/A
Severe	4 (12.5)	N/A	9 (28.1)	N/A
Medication during last month:				
UDCA	33 (100)	11 (100)	0 (0)	0 (0)
5-ASA	26 (81.3)	0 (0)	31 (96.9)	0 (0)
Corticosteroids	12 (37.5)	2 (18.2)	3 (9.4)	0 (0)
Azathioprine	13 (40.6)	1 (9.1)	14 (43.8)	0 (0)
Anti-TNF α	0 (0)	0 (0)	10 (31.3)	0 (0)
Probiotics, <i>E. coli</i> Nissle 1917	4 (12.5)	1 (9.1)	9 (28.1)	0 (0)

PSC: Primary sclerosing cholangitis; IBD: Inflammatory bowel disease; UC: Ulcerative colitis; AIH: Autoimmune hepatitis; UDCA: Ursodeoxycholic acid; ASA: Aminosalicilic acid

with HCs was apparent from differences in the Chao1 and Shannon indices, the decrease was particularly clear in patients with IBD, especially in the UC group. No evident differences in the Simpson indices of the groups were observed (Figure 1).

The global microbiota composition was clearly shifted by the presence of liver disease in PSC patients compared with HCs (Adonis $R^2 = 0.021$, $P = 0.001$; Figure 2A). Similarly, samples from patients with IBD clustered separately, depending significantly on the UC factor (Adonis $R^2 = 0.021$, $P < 0.001$) (Figure 2B). However, the homogeneity of group dispersion was significantly different when measured with Permdisp ($P > 0.1$). No such significant shifts were detected when comparing PSC and PSC-IBD groups. The disruption of bacterial beta diversity is shown in stack plots (Figure 3).

***Rothia* and five other genera were increased in PSC regardless of concomitant IBD**

We compared relative abundance corrected for FDR, and identified 12 genera that were significantly increased in patients with PSC compared with HCs (Table 2). Seven of these remained relatively more abundant regardless of concomitant IBD. These were *Rothia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Veillonella* and *Haemophilus*. On the other hand, *Coprobacillus*, *Escherichia*, *Corynebacterium* and *Lactobacillus* genera were associated with PSC-IBD, but not with isolated PSC. A distinct increase in the relative abundance of family *Micrococcaceae* ($P < 0.001$) in PSC and PSC-IBD ($P < 0.05$) was driven by the strong overrepresentation of *Rothia*. Similarly, enrichment of genus *Lactobacillus* and *Streptococcus*

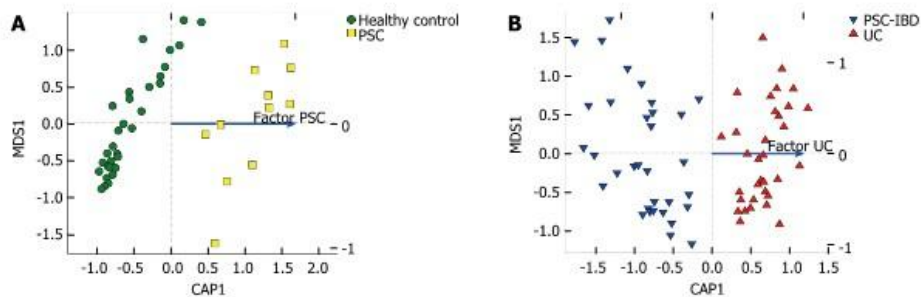


Figure 2 Ordination plots shows a distinct clustering pattern of sampled bacterial communities, explained either by the liver damage (primary sclerosing cholangitis vs Healthy controls) (A) and by the intestinal inflammation (primary sclerosing cholangitis-inflammatory bowel disease vs ulcerative colitis) (B). Both graphs are based on unweighted Unifrac distance matrix and constructed by PERMANOVA. PSC: Primary sclerosing cholangitis; UC: Ulcerative colitis; IBD: Inflammatory bowel disease.

Table 2 Statistical expression of relative abundances disruption in the study groups at genus level

Genus	PSC	PSC-IBD	UC
<i>Rothia</i>	↑↑↑	↑↑	NS
<i>Enterococcus</i>	↑↑↑	↑↑	NS
<i>Streptococcus</i>	↑↑	↑↑	NS
<i>Clostridium</i>	↑↑	↑	NS
<i>Veillonella</i>	↑	↑	NS
<i>Haemophilus</i>	↑	↑	NS
<i>Staphylococcus</i>	NS	↑	NS
<i>Coprococcus</i>	NS	↑	NS
<i>Escherichia</i>	NS	↑	NS
<i>Corynebacterium</i>	NS	↑	NS
<i>Lactobacillus</i>	NS	↑	NS
<i>Coprococcus</i>	↓↓	↓↓	↓↓
<i>Phascolarctobacterium</i>	NS	↓↓	↓↓
<i>Akkermansia</i>	NS	NS	↓↓↓
<i>Roseburia</i>	NS	NS	↓

Only taxa with $P < 0.05$ in at least one group are presented. ↑↑↑, ↓↓↓: Increased, decreased with $P < 0.001$; ↑↑, ↓↓: $P < 0.01$; ↑, ↓: $P < 0.05$; NS: Non-significant; PSC: Primary sclerosing cholangitis; IBD: Inflammatory bowel disease; UC: Ulcerative colitis.

along with increase of family *Carnobacteriaceae* ($P < 0.01$) was responsible for a significant increase of order *Lactobacillales* ($P < 0.001$) and class *Bacilli* ($P < 0.001$) in patients with PSC-IBD. Additionally, genus *Coprococcus* was significantly reduced ($P < 0.01$) in all diseased individuals, including those with PSC and UC, along with several other unidentified genera and species belonging to family *Lachnospiraceae*. A low abundance of genus *Phascolarctobacterium* positively correlated ($P < 0.01$) with the presence of IBD, both PSC-IBD and UC.

At the species level, seven taxa belonging to genera *Rothia*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Veillonella*, were overrepresented, specifically in PSC patients, compared with both HCs and patients with UC (Table 3). Conversely, abundance of *Prevotella copri* was negatively associated with PSC, particularly in patients with concomitant IBD ($P < 0.001$). A highly significant decrease of *Adlercreutzia equolifaciens* ($P < 0.001$)

was detected only in PSC patients without concomitant IBD. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Coprococcus catus* and *Ruminococcus gnavus* were decreased in all patients compared with HCs.

Several species clearly distinguish PSC-IBD from UC patients

A distinct dysbiotic pattern characterized by the significant underrepresentation of phylum *Verrucomicrobia* ($P < 0.001$) distinguished patients in the UC group from HCs. The low signal of this group of bacteria was also evident at the family (*Verrucomicrobiaceae*, $P < 0.001$) and genus (*Akkermansia*, $P < 0.001$) levels and with the extremely low abundance of *Akkermansia muciniphila* ($P < 0.001$), reduction of *Butyrivibrio pullitaeorum* ($P < 0.05$) and genus *Roseburia* ($P < 0.05$). The decrease of genus *Akkermansia* ($P < 0.01$) and *Akkermansia muciniphila* ($P < 0.01$) remained significant (along with the respective family and phylum signals) when compared with microbiota from PSC-IBD patients. Furthermore, *Clostridium colinum* was significantly underrepresented when compared with both HCs ($P < 0.001$) and PSC-IBD patients ($P < 0.01$). On the other hand, three genera that distinguished PSC patients from HCs (*Rothia*, $P < 0.05$; *Streptococcus*, $P < 0.05$; *Veillonella*, $P < 0.05$) were increased in PSC-IBD compared to UC. The pattern continued at the species level with *R. mucilaginosa* ($P < 0.05$), *V. parvula* ($P < 0.05$), *V. dispar* ($P < 0.05$), and unclassified species of genus *Streptococcus* ($P < 0.01$) and genus *Blautia* ($P < 0.05$). Order *Fusobacteriales* ($P < 0.01$) and family *Fusobacteriaceae* ($P < 0.05$) were more abundant in UC than in PSC-IBD, but we were not able to track this tendency to lower taxonomic levels (Tables 2 and 3).

Disturbance in order *Actinomycetales* correlates with serum albumin levels in the overall population and has a distinct pattern in patients with PSC/AIH overlap
In the multivariate analysis, an OTU (operational taxonomic unit) belonging to genus *Actinomycetes*

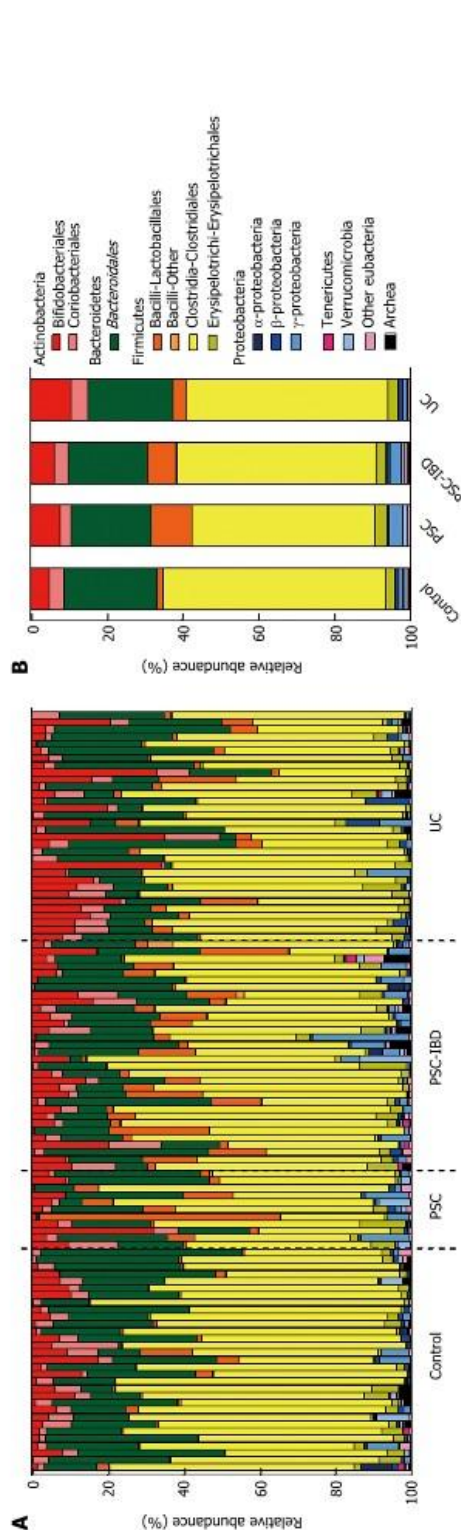


Figure 3 Median relative abundances of microbiota at order-level in all study subjects (A) and averaged for each study group (B). We identified (mean \pm SD) 40.83% \pm 10.00% of sequences on the species level and 84.18% \pm 6.83% of sequences on the genus level. PSC: Primary sclerosing cholangitis; UC: Ulcerative colitis; IBD: Inflammatory bowel disease.

was significantly ($P < 0.01$) enriched, when overlapping AIH was present in patients with PSC (including those with UC and from HCs). Multivariate analysis using MaAsLin found a significant tendency of order Actinomycetales to be increased in study subjects with low serum albumin level ($P < 0.01$). This finding was no longer significant when adjusting for the specific patient groups and HCs (Figure 4).

DISCUSSION

The intestinal microbiota is involved in the pathogenesis of various diseases and is, therefore, a potential biomarker or even a therapeutic target^[33]. We identified specific signatures of the fecal microbiota that distinguished patients with PSC from those with UC and from HCs. This is the first study of its kind from central Europe, a region characterized by specific dietary habits. Moreover, since recruitment centre may have a serious impact on microbial composition in multi-centric studies^[18], we decided to perform this study in a single-centre design with meticulous care for consistency of sample collection, processing and analysis.

We found disruption of gut bacteria homeostasis in patients with UC, which was characterized by decreased microbial diversity. This is in line with previous studies in which low bacterial diversity was associated with IBD^[34]. Moreover, significant disease-specific shifts of global microbiota composition were apparent when comparing PSC patients with healthy controls and PSC-IBD with UC patients.

In complex diseases, several distinct environmental factors may influence the composition of the gut microbial community. In our series of PSC and PSC-IBD patients, it was apparent that liver disease was primary factor associated with disease-specific dysbiosis, independent of dysbiotic influences of IBD, as the changes in gut microbiota did not significantly differ in PSC patients with and without established, concomitant IBD. However, stratifying PSC patients into "with or without IBD" subphenotypes may be controversial because PSC-IBD may have a subclinical course that might be easily missed during endoscopic and histological assessment. In addition, there is no agreement on the recommended interval for endoscopic evaluation in patients with PSC and no clinical suspicion of IBD. Furthermore, previous

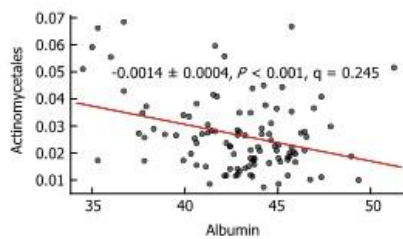


Figure 4 Abundance of order Actinomycetales negatively correlates with serum albumin levels in the total study population.

Table 3 Statistical expression of relative abundances disruption in the study groups at species level

Species	PSC	PSC-IBD	UC
<i>Rothia mucilaginosa</i>	↑↑↑	↑↑	NS
<i>Lactobacillus salivarius</i>	NS	↑↑↑	NS
<i>Streptococcus infantis</i>	↑↑	↑↑	NS
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	↑↑	↑↑	NS
<i>Streptococcus equi</i>	↑↑	↑↑	NS
<i>Veillonella dispar</i>	↑↑	↑↑	NS
<i>Veillonella parvula</i>	↑	↑↑	NS
<i>Prevotella copri</i>	↓	↓↓↓	NS
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	↓↓↓	NS	NS
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	↓	↓↓↓	↓↓
<i>Coprococcus catus</i>	↓	↓↓	↓
<i>Ruminococcus gnavus</i>	↓↓	↓↓	↓↓↓
<i>Akkermansia muciniphila</i>	NS	NS	↓↓↓
<i>Butyrivibrio pullicacorum</i>	NS	NS	↓↓↓
<i>Clostridium colinum</i>	NS	NS	↓↓↓

Only taxa with $P < 0.01$ in at least one group are presented. ↑↑↑, ↓↓↓: Increased, decreased with $P < 0.001$; ↑↑, ↓↓: $P < 0.01$; ↑, ↓: $P < 0.05$; NS: Non-significant; PSC: Primary sclerosing cholangitis; IBD: Inflammatory bowel disease; UC: Ulcerative colitis.

studies evaluated PSC-UC and PSC-CD as subgroups of their study cohorts^[13,16]. However, we assumed, that IBD in PSC rarely has macroscopic features typical for CD and that histological findings might be often misinterpreted and the diagnosis is often eventually changed to UC. Therefore, we included only patients with typical features of IBD associated with PSC and universally categorized the phenotype as PSC-IBD^[7].

We found a close association of the relative abundance of several genera with PSC, including *Rothia*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Veillonella*, *Clostridium*, and *Haemophilus* regardless of the presence or absence of concomitant IBD. The association of *Rothia* with PSC was the most striking, and to our knowledge, this is the first study to describe such a significant relation with PSC.

The increased abundance of genus *Rothia*, and *R. mucilaginosa* in particular, in patients with PSC suggests that oral microbiota may be overrepresented in the lower GI populations of patients with advanced liver disease, which is in line with previous reports^[35]. In previous studies, infections caused by *Rothia* species were predominantly found in immunocompromised

individuals and patients with indwelling vascular devices^[36]. Since *Rothia* is sensitive to gastric fluid^[37], we speculate, that our findings may reflect contamination of the intestinal microbial community by previous endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP), with repeated stenting in particular. Our data alone are insufficient to indicate a direct link to disease pathogenesis. However, recent reports of successful treatment of PSC and recurrent PSC with vancomycin^[12,38], suggest that *Rothia* or other vancomycin-sensitive microbes^[39] are reasonable targets of further research in this field.

The increased abundance of genera *Enterococcus* and *Lactobacillus* confirms the results of a recent complex study from Belgium^[36]. Even though we did not find a significant increase of genus *Fusobacterium* (one of three significantly increased genera in the Belgian study), we observed the clear enrichment of family *Fusobacteriaceae* in PSC-IBD patients ($P < 0.001$).

We could replicate previous results of enrichment of *Veillonella*, notably *V. parvula* and *V. dispar*, as a key feature of PSC-associated dysbiosis^[13]. Previously, this genus was associated with several other progressive fibrotic disorders^[40]. As in our study, Kummel *et al.*^[13] did not evaluate the influence of liver cirrhosis, which might be the condition that predisposes towards *Veillonella* increase, not necessarily PSC itself. This is further supported by Sabino *et al.*^[16] who found that *Veillonella* abundance in PSC was no longer significantly changed when patients with confirmed liver cirrhosis were excluded from the analysis. Sabino *et al.*^[16] diagnosed liver cirrhosis diagnosis biopsy and/or MRI imaging and/or elastography. Confirming cirrhosis in advanced cholestatic liver disease by elastography may be challenging because of imaging distortion, and biopsy can miss focally expressed morphological features^[41]. Therefore, it is not certain, whether the alteration in microbiota composition was a PSC-specific characteristic, or more likely reflects homeostatic disruption in advanced chronic liver disease in general.

In our dataset, genus *Adlercreutzia* was significantly decreased in PSC compared with HCs. *Adlercreutzia* is a genus that includes only one species (*A. equolifaciens*) capable of converting ingested isoflavones, which are abundant in legumes and soya beans, into equol^[42]. Equol has a high affinity for estrogen receptors (ERs) and may be a selective estrogen receptor modulator^[43]. ER expression on cholangiocytes is increased in cholestatic liver diseases but is absent in healthy individuals^[44]. Taking into account the fact that the prevalence of PSC is much decreased in women and Asian populations^[45] (and presumably in populations with higher than average consumption of isoflavones), we could speculate upon potential pathogenetic pathways with significant impact on disease development that are influenced by

dietary habits and endocrine signaling.

We observed a significant decrease of *Ruminococcus gnavus* in all diseased individuals, Png *et al.*^[46] described a manifold increase of this mucin-degrading species in the colonic mucosa of both CD and UC patients. This discrepancy could be, however, caused by the fact that the luminal and mucosal microbiota are significantly different^[47]. The low abundance of another mucolytic bacteria, *Akkermansia muciniphila* (and therefore genus *Akkermansia*), in UC is consistent with Png *et al.*^[46]. The absence of this bacterium from the microbial community could affect the use of mucins as a carbon sources by other bacteria that are important members of microbial community in healthy individuals^[46]. In our study, the UC phenotype was characterized by a substantial decrease of *Butyrivibrio pullicaecorum* sp., which is in line with Eeckhaut *et al.*^[48] who found that *B. pullicaecorum* attenuated trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats, and that supernatants of cultures of *B. pullicaecorum* increased transepithelial resistance. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* has recently been reported in IBD-associated dysbiosis^[49,50], which also occurred in this study in both UC and with PSC. The decrease of *F. prausnitzii* was particularly significant in patients with an inflamed colon, regardless of IBD phenotype. The decreased abundance of *B. pullicaecorum*, *F. prausnitzii*, and genus *Roseburia* demonstrates disruption in butyrate-producing bacteria, which probably have anti-inflammatory activity. Furthermore, it has been proposed recently that the anti-inflammatory properties of *F. prausnitzii* is associated with the production of 15 kDa protein capable of inhibiting the NF- κ B pathway in intestinal epithelial cells^[51].

Bile acids and changes in production, circulation, and conversion may be associated with changes of microbiota composition^[52]. Microbiota might thus be influenced by long-term use of ursodeoxycholic acid (UDCA) leading to substantial changes in bile composition. Sabino *et al.*^[16] reported that only 66.7% of a series of 147 patients with PSC-UC used UDCA. In our series, all patients with an established diagnosis of PSC received UDCA as routine clinical practice at our center follows the recommendations of EASL^[53] and ECCO^[54], which are contradictory to the AASLD guidelines advocating against routine use of UDCA in PSC^[5]. We were thus not able to evaluate the influence of UDCA on microbiota composition. However, recent reports have not reported substantial differences in the microbiota of PSC patients treated or not treated with UDCA^[13,16].

The impact of antibiotics on gut microbiota composition is clear, but there is no consensus on how to adjust for the antibiotic use, we included only subjects who had not used antibiotics within the previous 3 mo. Sabino *et al.*^[16] enforced only 1 mo cutoff, and Kummen *et al.*^[13] observed no substantial differences related to antibiotic use within the previous 12 mo.

The role of biologics for PSC treatment is currently

not sufficiently clear. α 4 β 7 integrin antagonists have demonstrated a positive effect on PSC course^[55], and the effect of anti-TNF treatment is dubious^[56] with potential risk of serious adverse events^[57]. In our series, no PSC patients had been treated with biologics. Nearly one-third of the UC patients had received infliximab, adalimumab, or golimumab, but these agents did not result in microbial shifts that distinguished the UC group.

Multivariate analysis revealed a significant negative correlation of serum albumin level and the relative contribution of order Actinomycetales in the total study population. This might reflect a decrease in this microbial subgroup in patients with advanced liver disease and subsequent alteration of proteosynthesis. As the relation could not be assigned to any specific subgroup of patients, the relevance of this observation is not clear.

Due to the advances in sequencing and bio-informatics, we were able to found some of the most striking changes at the low taxonomic level (species). These disease-specific bacteria could be the cornerstone in search for suitable biomarkers for PSC development or in non-invasive distinguishing of different IBD phenotypes. The fact that most of our findings were consistent with those reported in previous studies validates the study design and methodology. The current evidence supports a key role of microbiota in PSC pathogenesis which, however, needs to be further elucidated by future mechanistic studies.

In conclusion, PSC- and UC-associated dysbiosis was characterized by reduced bacterial diversity, significant changes in global bacterial composition and relative abundance of distinct taxa, primarily at the genus and species levels. The most prominent changes related to PSC were in the genera *Rothia*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Haemophilus*, and *Adlercreutzia*. Several microbes including *Akkermansia muciniphila*, *Butyrivibrio pullicaecorum* and *Clostridium colinum* clearly distinguished the UC and PSC-IBD phenotypes. Specific changes in occurring with PSC/AIH overlap involved enrichment of *Actinomyces* spp.

COMMENTS

Background

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic liver disease with particularly high incidence in northern Europe and North America. Concomitant inflammatory bowel disease (IBD) is present in majority of patients with PSC. This IBD phenotype is distinct from Crohn's disease and ulcerative colitis and is often referred to as PSC-IBD. Gut microbiota composition is most likely involved in pathogenesis of this complex and often unfavorable clinical entity that involves the liver and intestine.

Research frontiers

Disruption of microbial ecology has previously been described in several clinical conditions including IBD. The few reports on gut microbiota composition in PSC and PSC-IBD have used diverse methods and yielded inconsistent results.

Innovations and breakthroughs

This study describes specific gut microbial patterns associated with PSC and differ in individual IBD phenotypes (UC and PSC-IBD).

Applications

Identifying disease-specific microbial features could be the cornerstone of further research in the field of PSC and IBD pathogenesis as well as the search for suitable biomarkers.

Terminology

PSC is a severe liver disease characterized by fibrosis and stenosis of both intra- and extrahepatic bile ducts; PSC-IBD is a specific phenotype of inflammatory bowel disease associated with PSC; gut microbiota comprises the ecological community of microorganisms residing in the (human) intestine.

Peer-review

Interesting and complex article, a very good work and a beautiful writing. It was difficult to read, because includes so many data, but also very useful in the end.

REFERENCES

- Gow PJ, Chapman RW. Liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Liver* 2000; **20**: 97-103 [PMID: 10847476]
- Chapman RW, Arborgh BA, Rhodes JM, Summerfield JA, Dick R, Scheuer PJ, Sherlock S. Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. *Gut* 1980; **21**: 870-877 [PMID: 7439807]
- Levy C, Lindor KD. Primary sclerosing cholangitis: epidemiology, natural history, and prognosis. *Semin Liver Dis* 2006; **26**: 22-30 [PMID: 16496230 DOI: 10.1055/s-2006-933560]
- Karlsen TH, Schrumpf E, Bøberg KM. Update on primary sclerosing cholangitis. *Dig Liver Dis* 2010; **42**: 390-400 [PMID: 20172772 DOI: 10.1016/j.dld.2010.01.011]
- Chapman R, Fevery J, Kalloo A, Nagorney DM, Bøberg KM, Schneider B, Gores GJ. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2010; **51**: 660-678 [PMID: 20101749 DOI: 10.1002/hep.23294]
- Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 2013; **382**: 1587-1599 [PMID: 23810223 DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60096-3]
- Loftus EV, Harewood GC, Loftus CG, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Jewell DA, Sandborn WJ. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2005; **54**: 91-96 [PMID: 15591511 DOI: 10.1136/gut.2004.046615]
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; **134**: 577-594 [PMID: 18242222 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.059]
- Bentley RW, Keenan JJ, Gearry RB, Kennedy MA, Barclay ML, Roberts RL. Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in a population-based cohort of patients with Crohn's disease and control subjects. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 1168-1172 [PMID: 18371139 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01742.x]
- Tannock GW. Molecular analysis of the intestinal microflora in IBD. *Mucosal Immunol* 2008; **1** Suppl 1: S15-S18 [PMID: 19079221 DOI: 10.1038/mi.2008.54]
- Lichtman SN, Keku J, Clark RL, Schwab JH, Sartor RB. Biliary tract disease in rats with experimental small bowel bacterial overgrowth. *Hepatology* 1991; **13**: 766-772 [PMID: 2010172]
- Tabibian JH, Weeding E, Jorgensen RA, Petz JL, Keach JC, Talwalkar JA, Lindor KD. Randomised clinical trial: vancomycin or metronidazole in patients with primary sclerosing cholangitis - a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; **37**: 604-612 [PMID: 23384404 DOI: 10.1111/apt.12232]
- Kummen M, Holm K, Anmarkrud JA, Nygård S, Vesterhus M, Høivik ML, Trøseid M, Marschall HU, Schrumpf E, Moum B, Røsjø H, Aukrust P, Karlsen TH, Hov JR. The gut microbial profile in patients with primary sclerosing cholangitis is distinct from patients with ulcerative colitis without biliary disease and healthy controls. *Gut* 2017; **66**: 611-619 [PMID: 26887816 DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310500]
- Kummen M, Hov JR. Response to 'Faecal microbiota profiles as diagnostic biomarkers in primary sclerosing cholangitis' by Rühlemann et al. *Gut* 2017; **66**: 755-756 [PMID: 27340191 DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312347]
- Torres J, Bao X, Goel A, Colombel JF, Pekow J, Jabri B, Williams KM, Castillo A, Odin JA, Meckel K, Fasihuddin F, Peter I, Itzkowitz S, Hu J. The features of mucosa-associated microbiota in primary sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; **43**: 790-801 [PMID: 26857969 DOI: 10.1111/apt.13552]
- Sabino J, Vieira-Silva S, Machiels K, Joossens M, Falony G, Ballet V, Ferrante M, Van Assche G, Van der Merwe S, Vermeire S, Raes J. Primary sclerosing cholangitis is characterised by intestinal dysbiosis independent from IBD. *Gut* 2016; **65**: 1681-1689 [PMID: 27207975 DOI: 10.1136/gutjnl-2015-311004]
- Quraishi MN, Sergeant M, Kay G, Iqbal T, Chan J, Constantinidou C, Trivedi P, Ferguson J, Adams DH, Pallen M, Hirschfield GM. The gut-adherent microbiota of PSC-IBD is distinct to that of IBD. *Gut* 2017; **66**: 386-388 [PMID: 27196590 DOI: 10.1136/gutjnl-2016-311915]
- Kevans D, Tyler AD, Holm K, Jørgensen KK, Vatn MH, Karlsen TH, Kaplan GG, Eksteen B, Gevers D, Hov JR, Silverberg MS. Characterization of Intestinal Microbiota in Ulcerative Colitis Patients with and without Primary Sclerosing Cholangitis. *J Crohns Colitis* 2016; **10**: 330-337 [PMID: 26526357 DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjv204]
- Rossen NG, Fuentes S, Boonstra K, D'Haens GR, Heilig HG, Zoetendal EG, de Vos WM, Ponsioen CY. The mucosa-associated microbiota of PSC patients is characterized by low diversity and low abundance of uncultured Clostridiales II. *J Crohns Colitis* 2015; **9**: 342-348 [PMID: 25547975 DOI: 10.1093/ecco-jcc/jju023]
- Rühlemann MC, Heinsen FA, Zenouzi R, Lieb W, Franke A, Schramm C. Faecal microbiota profiles as diagnostic biomarkers in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2017; **66**: 753-754 [PMID: 27216937 DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312180]
- Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, Azpiroz F, Roca J, Guarner F, Manichanh C. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol* 2012; **12**: 158 [PMID: 22846661 DOI: 10.1186/1471-2180-12-158]
- Tedjo DI, Jonkers DM, Savelkoul PH, Masclee AA, van Best N, Pierik MJ, Penders J. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PLoS One* 2015; **10**: e0126685 [PMID: 26024217 DOI: 10.1371/journal.pone.0126685]
- Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* 2005; **89**: 670-679 [PMID: 15696537 DOI: 10.1002/bit.20347]
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JJ, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; **7**: 335-336 [PMID: 20383131]
- Edgar RC, Flyvbjerg H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 2015; **31**: 3476-3482 [PMID: 26139637 DOI: 10.1093/bioinformatics/btv401]
- Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2005; **71**: 8228-8235 [PMID: 16332807 DOI: 10.1128/AEM.71.12.8228-

- 8235.2005]
- 27 Tickle T, Waldron L, Yiren Lu HC. Multivariate association of microbial communities with rich metadata in high-dimensional studies
 - 28 Beuers U. Hepatic overlap syndromes. *J Hepatol* 2005; **42** Suppl: S93-S99 [PMID: 15777577 DOI: 10.1016/j.jhep.2004.11.009]
 - 29 Beuers U, Rust C. Overlap syndromes. *Semin Liver Dis* 2005; **25**: 311-320 [PMID: 16143946 DOI: 10.1055/s-2005-916322]
 - 30 Lindor KD, Kowdley KV, Harrison ME. ACG Clinical Guideline: Primary Sclerosing Cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2015; **110**: 646-659; quiz 660 [PMID: 25869391 DOI: 10.1038/ajg.2015.112]
 - 31 Langan RC, Gotsch PB, Krafczyk MA, Skilling DD. Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2007; **76**: 1323-1330 [PMID: 18019875]
 - 32 Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987; **317**: 1625-1629 [PMID: 3317057 DOI: 10.1056/NEJM198712243172603]
 - 33 Kverka M, Tlaskalova-Hogenova H. Intestinal Microbiota: Facts and Fiction. *Dig Dis* 2017; **35**: 139-147 [PMID: 28147364 DOI: 10.1159/000449095]
 - 34 Alipour M, Zaidi D, Valcheva R, Jovel J, Martinez I, Sergi C, Walter J, Mason AL, Wong GK, Dieleman LA, Carroll MW, Huynh HQ, Wine E. Mucosal Barrier Depletion and Loss of Bacterial Diversity are Primary Abnormalities in Paediatric Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* 2016; **10**: 462-471 [PMID: 26660940 DOI: 10.1093/ecco-jcc/jiv223]
 - 35 Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, Guo J, Le Chatelier E, Yao J, Wu L, Zhou J, Ni S, Liu L, Pons N, Batto JM, Kennedy SP, Leonard P, Yuan C, Ding W, Chen Y, Hu X, Zheng B, Qian G, Xu W, Ehrlich SD, Zheng S, Li L. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 2014; **513**: 59-64 [PMID: 25079328 DOI: 10.1038/nature13568]
 - 36 Ramanan P, Barreto JN, Osmon DR, Tosh PK. Rothia bacteremia: a 10-year experience at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 3184-3189 [PMID: 24951810 DOI: 10.1128/JCM.01270-14]
 - 37 Rosen R, Amirault J, Liu H, Mitchell P, Hu L, Khatwa U, Onderdonk A. Changes in gastric and lung microflora with acid suppression: acid suppression and bacterial growth. *JAMA Pediatr* 2014; **168**: 932-937 [PMID: 25133779 DOI: 10.1001/jamapediatrics.2014.696]
 - 38 Davies YK, Tsay CJ, Caccamo DV, Cox KM, Castillo RO, Cox KL. Successful treatment of recurrent primary sclerosing cholangitis after orthotopic liver transplantation with oral vancomycin. *Case Rep Transplant* 2013; **2013**: 314292 [PMID: 23509657 DOI: 10.1155/2013/314292]
 - 39 McWhinney PH, Kibbler CC, Gillespie SH, Patel S, Morrison D, Hoffbrand AV, Prentice HG. *Stomatococcus mucilaginosus*: an emerging pathogen in neutropenic patients. *Clin Infect Dis* 1992; **14**: 641-646 [PMID: 1562654]
 - 40 Bajaj JS, Hylemon PB, Ridlon JM, Heuman DM, Daita K, White MB, Monteith P, Noble NA, Sikaroodi M, Gillevet PM. Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encephalopathy and is linked to cognition and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; **303**: G675-G685 [PMID: 22821944 DOI: 10.1152/ajpgi.00152.2012]
 - 41 Mjelle AB, Mulabecirovic A, Hausken T, Havre RF, Gilja OH, Vesterhus M. Ultrasound and Point Shear Wave Elastography in Livers of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. *Ultrasound Med Biol* 2016; **42**: 2146-2155 [PMID: 27262519 DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.04.016]
 - 42 Maruo T, Sakamoto M, Ito C, Toda T, Benno Y. *Adlercreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *Eqgerthella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; **58**: 1221-1227 [PMID: 18450717 DOI: 10.1099/ijs.0.65404-0]
 - 43 Setchell KD, Zhao X, Jha P, Heubi JE, Brown NM. The pharmacokinetic behavior of the soy isoflavone metabolite S-(+)-equol and its diastereoisomer R-(+)-equol in healthy adults determined by using stable-isotope-labeled tracers. *Am J Clin Nutr* 2009; **90**: 1029-1037 [PMID: 19710188 DOI: 10.3945/ajcn.2009.27981]
 - 44 Alvaro D, Invernizzi P, Onori P, Franchitto A, De Santis A, Crosignani A, Sferri R, Ginanni-Corradini S, Mancino MG, Maggioni M, Attili AF, Podda M, Gaudio E. Estrogen receptors in cholangiocytes and the progression of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2004; **41**: 905-912 [PMID: 15645536]
 - 45 Tamura S, Sugawara Y, Kokudo N. Primary sclerosing cholangitis as an intractable disease. *Intractable Rare Dis Res* 2012; **1**: 13-17 [PMID: 25343066 DOI: 10.5582/ir.2012.v1.1.13]
 - 46 Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, McGuckin MA, Florin TH. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010; **105**: 2420-2428 [PMID: 20648002 DOI: 10.1038/ajg.2010.281]
 - 47 Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**: 3401-3407 [PMID: 12089021]
 - 48 Eeckhaut V, Machiels K, Perrier C, Romero C, Maes S, Flahou B, Steppe M, Haesebrouck F, Sas B, Ducatelle R, Vermeire S, Van Immerseel F. *Butyrivibrio* pulicacorum in inflammatory bowel disease. *Gut* 2013; **62**: 1745-1752 [PMID: 23263527 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303611]
 - 49 Duboc H, Rajca S, Rainteau D, Benarous D, Maubert MA, Quervain E, Thomas G, Barbu V, Humbert L, Despras G, Bridonneau C, Dumetz F, Grill JP, Masliah J, Beaugerie L, Cosnes J, Chazouillères O, Poupon R, Wolf C, Mallet JM, Langella P, Trugnan G, Sokol H, Seksik P. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013; **62**: 531-539 [PMID: 22993202 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302578]
 - 50 Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; **28**: 613-619 [PMID: 23216550 DOI: 10.1111/jgh.12073]
 - 51 Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermúdez-Humarán LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill JP, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 2016; **65**: 415-425 [PMID: 26045134 DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307649]
 - 52 Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 2005; **29**: 625-651 [PMID: 16102595 DOI: 10.1016/j.femsre.2004.09.003]
 - 53 European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009; **51**: 237-267 [PMID: 19501929 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.04.009]
 - 54 Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, Danese S, Gionchetti P, Moser G, Beaugerie L, Gomollón F, Häuser W, Herrlinger K, Oldenburg B, Panes J, Portela F, Rogler G, Stein J, Tilg H, Travis S, Lindsay JO. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis* 2013; **7**: 1-33 [PMID: 23040453 DOI: 10.1016/j.crohns.2012.09.005]
 - 55 Halilbasic E, Fuchs C, Hofer H, Paumgartner G, Trauner M. Therapy of Primary Sclerosing Cholangitis—Today and Tomorrow. *Dig Dis* 2015; **33** Suppl 2: 149-163 [PMID: 26641242 DOI: 10.1159/000440827]
 - 56 Hommes DW, Erkelens W, Ponsioen C, Stokkers P, Rauws E, van der Spek M, ten Kate F, van Deventer SJ. A double-blind, placebo-controlled, randomized study of infliximab in primary sclerosing cholangitis. *J Clin Gastroenterol* 2008; **42**: 522-526 [PMID: 18344886 DOI: 10.1097/MCG.0b013e318166242e]

- 57 **Franceschet I**, Cazzagon N, Del Ross T, D'Incà R, Buja A, Floreani A. Primary sclerosing cholangitis associated with inflammatory bowel disease: an observational study in a Southern

Europe population focusing on new therapeutic options. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2016; **28**: 508-513 [PMID: 26872110 DOI: 10.1097/MEG.0000000000000596]

P- Reviewer: Chu J, Lakatos PL, Popp C **S- Editor:** Qi Y
L- Editor: A **E- Editor:** Zhang FF



PUBLIKACE 3

Možnosti terapeutické manipulace se střevní mikrobiotou

Pavel Drastich¹, Lukáš Bajer¹, Miloslav Kverka^{2,3}

¹Klinika hepatogastroenterologie IKEM, Praha

²Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

³Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha

Souhrn

Střevní mikrobiota, komplexní ekosystém mikroorganismů obývajících střevo, je nezbytná pro správný vývoj řady fyziologických funkcí včetně maturace imunitního systému hostitele. Díky rozvoji nových laboratorních metod byla v nedávné době nalezena u řady chorob porucha její rovnováhy, což poukazuje na její význam pro udržení zdraví jedince. Zároveň to ale ukazuje, že by mohla být cílem terapeutických, anebo dokonce preventivních zásahů. Tyto zásahy zahrnují změnu diety, podávání probiotik, prebiotik či antibiotik, a zejména fekální mikrobiální transplantaci (FMT). Úspěch FMT v léčbě rekurentní infekce *Clostridium difficile* otevřel zájem o její využití i v léčbě dalších onemocnění, která jsou spojována s poruchou mikrobioty, jako je např. ulcerózní kolitida nebo metabolický syndrom.

Klíčová slova: *Clostridium difficile* – dysbióza – fekální mikrobiální transplantace – probiotika – střevní mikrobiota

Possibilities of therapeutic manipulation of the gut microbiota

Summary

Human gut microbiota, complex ecosystem of microbes associated with human gut, is essential for the development of the host's immune system and many other physiological functions. Recently, numerous diseases and syndromes were associated with disruption of this ecosystem thus stressing its importance in maintaining the host's health. Growing evidence suggests that by manipulating the gut microbiota, some of these diseases could be treated or even prevented. These manipulations include changes in diet, use of probiotics, prebiotics, antibiotics and fecal microbiota transplantation (FMT). The successes in FMT treatment of recurrent infection of *Clostridium difficile* led recently to a great interest in extending this treatment modality to other diseases with proven disruption of gut microbiota, such as ulcerative colitis or metabolic syndrome.

Key words: *Clostridium difficile* – dysbiosis – fecal microbial transplantation – microbiota – prebiotics – probiotics

Úvod

Mikroby jsou v centru zájmu medicíny již od poloviny 19. století, kdy Robert Koch poprvé experimentálně prokázal jejich vliv na lidské zdraví. Do nedávné minulosti byl však směr tohoto zájmu zaměřený spíše na původce infekčních onemocnění – patogenní mikroorganismy. Vztah mikroorganismů s makroorganizmem je však mnohem širší a většina mikrobů žijících na povrchu i uvnitř našich těl patří mezi komenzály. Některé z nich nám poskytují užitečné vlastnosti, které vhodně doplňují vlastnosti kódované genetickým kódem našich buněk [1]. Studium mechanismů, jakými mikroby udržují zdraví a jakým způsobem můžeme mikroby využít k příznivému ovlivnění průběhu chorob, je v současnosti předmětem intenzivního výzkumu.

Soubor všech mikrobů, který se nachází u daného jedince, nazýváme mikrobiota (dříve označována jako

mikroflóra) nebo mikrobiom. Přestože všechny tělesné povrchy, vnější i vnitřní, jsou osídleny mikroby, největší část mikrobioty se nachází ve střevě (zejména tlustém). U lidí představuje střevní mikrobiota nesmírně rozsáhlý ekosystém, který se skládá z přibližně 1 000 různých druhů bakterií a zástupců zhruba 5 různých rodů archeí, 66 různých rodů hub, a z velkého množství virů, které patří zejména mezi bakteriofágy [2–4]. Studie na bezmikrobních zvířatech jednoznačně ukázaly, že bez tohoto komplexního ekosystému by ani náš imunitní systém, ani řada dalších fyziologických funkcí nedosáhly svého plného potenciálu [5–7]. Střevo představuje poměrně unikátní ekologickou nikou, pro kterou je charakteristická stálá teplota, anaerobní prostředí, přítomnost enzymů, žlučových kyselin a značného množství živin. Základní složení střevní mikrobioty se formuje během prvních 3 let života a je charakterizována domi-

nancí některých tříd kmene *Bacteroidetes* (zejména *Bacteroidia*) a *Firmicutes* (zejména *Clostridia* a *Bacilli*). Vzhledem ke specifickým vlastnostem střeva je zastoupení hlavních složek mikrobioty podobné u všech lidí a má u daného jedince poměrně stabilní složení [8,9]. To však neplatí na nižší taxonomické úrovni, na níž jsou mezi jedinci značné rozdíly a kde během života dochází k výraznější fluktuaci. Mikroby se dokonce podílejí i na synchronizaci biologických hodin s cirkadiánním rytmem a regulují tvorbu tukových zásob [10,11]. K výrazným změnám ve složení střevní mikrobioty pak může dojít např. dlouhodobou změnou diety, infekcí anebo třeba léčbou antibiotiky [12–14].

Na kolonizaci hostitele mikroby se podílí řada faktorů. Kromě faktorů zmiňovaných výše (např. vlastnosti niky, dieta a užívání antibiotik) je složení střevního mikrobiomu ovlivněno přítomností mikrobů v okolí a kolonizací po porodu – významnou úlohu hraje časná kolonizace mikrobů při průchodu porodním kanálem. Na straně hostitele hraje významnou úlohu imunitní systém, který u zdravých lidí rychle eliminuje patogenní mikroorganismy a naopak ignoruje mikroby komenzální [15]. V případě selhání imunitního systému musí tuto funkci částečně zastoupit buňky střevního epitelu, které pak „zanedbávají“ absorpci živin. To má za následek doposud nevysvětlitelné hubnutí, které je typické pro pacienty s imunodeficií (např. CVID a AIDS) [16]. Spojení výše popsáných vlastností střeva a reaktivity přirozené a adaptivní imunity umožňují hostiteli ovlivnit kolonizaci jednotlivých částí střeva mikroby [17].

Naopak mikroby značně ovlivňují fungování organismu, a tak není překvapivé, že poruchu složení či funkce střevního mikrobiomu, tzv. dysbiózu, nacházíme u více než 25 různých chorob [18]. Jednou z obvyklých charakteristik dysbiózy je ztráta mikrobiální diverzity, která zhoršuje adaptaci organismu na měnící se prostředí. Tento stav je typický pro náš „západní“ moderní životní styl a mohl by vysvětlit nárůst některých chorob ve vyspělých zemích [19]. Kromě chorob trávicího traktu (např. idiopatické střevní záněty – inflammatory bowel disease/IBD, kolorektální karcinom nebo syndrom dráždivého tračníku) jde kupříkladu o onemocnění metabolická (např. obezita, nealkoholická jaterní steatóza/NonAlcoholic SteatoSisHepatis – NASH, diabetes mellitus 2. typu) nebo neurologická a psychiatrická [20–23]. I když je ve většině případů dysbióza u těchto onemocnění dobře prokázána, není obvykle jasné, zda je mikrobiota příčinou, následkem či průvodním jevem daného onemocnění [24]. Je však nutné upozornit, že snížení mikrobiální diverzity je relativní pojem, protože v porovnání s primitivními lovci-sběrači (např. východoafrický kmen Hadza) má střevní mikrobiota zdravých obyvatel vyspělých zemí velice nízkou diverzitu [25].

Střevní bakterie mají také klíčovou roli v metabolismu žlučových kyselin a narušení složení střevní mikrobioty bylo popsáno též u cholestatických jaterních chorob, zejména primární sklerozující cholangitidy (PSC) [26]. Změna střevní mikrobioty tak může ovlivnit enterohepatální oběh žlučových kyselin, a tím i kompozici žluči. Alte-

race složení žluči naopak může vést k selektivnímu tlaku na konkrétní skupiny bakterií, což lze hypoteticky využít i v terapeutických přístupech [27].

Studium střevní mikrobioty

Nový zájem o mikrobiotu je dán nedávným pokrokem v laboratorních technikách a sofistikovaných bioinformatických přístupech, které umožňují studovat celá komplexní mikrobiální společenstva [24]. Tyto nové techniky zahrnují metataxononii a metagenomiku, které umožňují rychlou analýzu celých mikrobiálních společenstev bez nutnosti kultivace a metatranskriptomiku a metabolomiku pro detailní studium jejich fungování [28]. Nicméně těžištěm studia vlivu mikrobů na zdraví jedince a pro studium interakce mezi mikrobem a hostitelem je gnotobiologie. Gnotobiologie se zabývá studiem organismů žijících v přítomnosti přesně definovaných mikroorganismů (tzv. cíleně kolonizovaná zvířata) nebo bez přítomnosti jakýchkoli mikrobů (tzv. bezmikrobiální zvířata). Takové experimenty umožňují studovat, jak jednotlivé mikroby ovlivňují fyziologické funkce [29,30]. Navíc je možné takto studovat vlastnosti mikrobů v živém organismu, které se mohou významně lišit oproti vlastnostem mikrobů pěstovaných in vitro [31,32].

Možnosti modulace střevní mikrobioty

Střevní mikrobiota je velmi slibným terapeutickým cílem, protože na rozdíl od genetické výbavy jedince je dnes již možné složení mikrobioty aktivně ovlivnit. Manipulace se střevní mikrobiotou by mohla být užitečná v léčbě nejen gastrointestinálních, ale i řady metabolických a neurologických onemocnění. Do spektra modulace s mikrobiotou patří dieta (změna složení potravy), podávání probiotik, prebiotik a antibiotik a fekální mikrobiální transplantace – FMT (Fecal Microbiota Transplantation).

Možnosti ovlivnění mikrobiomu (manipulace):

- dieta
- antibiotika
- probiotika (laktobacily, bifidobakterie, *Escherichia coli*)
- prebiotika (např. fruktooligosacharidy, inulin)
- synbiotika (směs prebiotik a probiotik)
- modifikace žlučových kyselin
- fekální mikrobiální transplantace

Dieta

Dieta je nejdůležitějším faktorem regulujícím střevní mikrobiotu [33]. Epidemiologické studie prokázaly, že dieta ovlivňuje vznik nemocí a že např. nízký příjem vlákniny je spojen s vyšším rizikem trávicích a metabolických chorob [34]. Podávání tzv. FIT diety (semivegetariánská, bohatá na vlákninu, s nízkým obsahem sulfidů a nasycených mastných kyselin, bez přidaného cukru, průmyslově zpracovaných potravin, karagenanů a polysorbátu 80) bylo spojeno u zdravých dobrovolníků se signifikantním zvýšením mikrobiální diverzity a se signifikantním snížením hladiny fekálního kalprotektinu [35]. V posledních letech se ke zlepšení klinických projevů u pacientů

s dráždivým tračníkem často doporučují úpravy diety, a to především restrikce v oblasti fermentovatelných oligosacharidů, disacharidů, monosacharidů a polyolů (tzv. dieta s nízkým obsahem FODMAPs). Recentní studie ukazují prospěšnost této diety u většiny pacientů s dráždivým tračníkem [36]. Dá se předpokládat, že tento efekt diety může být mediován změnou mikrobioty.

Zajímavá je interakce mezi mikrobiotou a dietou při vzniku kolorektálního karcinomu. Dysbióza nebo strava s nízkým obsahem vlákniny mohou vést k nižší produkci metabolitů chránících střevní sliznici (viz dále), a tím k vyššímu riziku vzniku střevního zánětu. Zánět je následně akcelerován toxiny, které vznikají z některých složek potravy činností mikroorganismů a následně dochází k rozvoji chronického zánětu. Ve spojení s genetickou nestabilitou střevních epitelových buněk vede zánět k selhání kontroly proliferace epitelu a vzniku nádoru [37]. Některé bakterie totiž mohou metabolizováním prokarcinogenů v potravě produkovat genotoxické látky, které pak způsobí poškození DNA, selhání opravných mechanismů a narušení buněčného cyklu u buněk hostitele [38].

Prebiotika, synbiotika a probiotika

Střevní mikrobiotu je možné ovlivnit přímo, podáváním prebiotik, probiotik anebo jejich kombinací – synbiotik. Prebiotika jsou nestravitelné látky (např. inulin), jejichž konzumace má příznivý fyziologický účinek na hostitele způsobený selektivní stimulací růstu nebo aktivity některých kmenů střevní mikrobioty. Tak se prebiotika dostávají v nezměněné formě do distálních částí trávicího traktu, kde jsou fermentovány bakteriemi. Tím prebiotika nejenom podporují růst některých mikroorganismů, ale fermentací z nich vznikají např. mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short-chain fatty acids – SCFA), mezi které patří zejména acetát, propionát a butyrát. SCFA jsou potom významným zdrojem energie pro střevní epitelové buňky, ale mohou mít i další lokální i systémové účinky. Např. propionát nebo butyrát produkovaný mikroby z vlákniny indukuje vznik regulačních buněk (CD4⁺FoxP3⁺ T-lymfocytů) ve stěně tlustého střeva, což výrazně zvyšuje odolnost zvířat k experimentálnímu střevnímu zánětu [39,40]. Na druhou stranu acetát produkovaný mikroby slouží jako signál, který vede ke střádání tuku a metabolickému syndromu [41].

Studie srovnávající evropské děti, které konzumují dietu s nízkým obsahem vlákniny, s africkými dětmi, v jejichž dietě je vyšší zastoupení vlákniny, ukázala, že dieta evropských dětí je provázána méně zdravou mikrobiotou. V druhé skupině v mikrobiotě dominovaly *Bacteroides* spolu s protizánětlivými SCFA. Podávání prebiotik, nebo také stravování s vysokým obsahem vlákniny by takto mohlo vést ke snížení zánětlivých onemocnění u dětí [42]. Navíc bylo navrženo, aby děti, které nemohou být kojené, dostaly prebiotické doplňky, aby se jejich mikrobiota podobala kojeným dětem [42]. V jiné studii s použitím prebiotické oligofruktózy zaznamenala léčená skupina méně relapsů souvisejících s průměrným způsobe-

ným *Clostridium difficile* v porovnání s placebovou skupinou. U pacientů užívajících prebiotika došlo k vyššímu zastoupení bifidobakterií ve vzorcích stolice, což potvrdilo účinek oligofruktózy [43]. Naopak některá aditiva, např. disacharid trehalóza, mohou selektivně zlepšovat růst a virulenci některých kmenů *Clostridium difficile*, a tím významně přispívat k epidemii pseudomembranózní kolitidy [44]. Prebiotika mohou snížit skóre klinické aktivity u ulcerózní kolitidy, vést ke snížení rizika agresivního průběhu onemocnění, nebo snížit riziko kolorektálního karcinomu [45]. V malé studii bylo prokázáno, že podávání prebiotika oligofruktózy pacientům s NASH vede ke zlepšení hladiny inzulinu a aminotransferáz [46].

Některé studie u člověka však poukázaly na fakt, že dieta s vysokým obsahem vlákniny nemusí být schopna obnovit zdravou mikrobiotu, jakmile je jednou mikrobiota u člověka ustanovena [42]. Kromě toho mohou prebiotika stimulovat růst potenciálně „prospěšných“ i „škodlivých“ bakterií. Dalším výzkumem je proto nezbytné určit, které prebiotické doplňky jsou optimální [47].

Snaha příznivě ovlivnit lidské zdraví podáváním mikroorganismů v potravě existuje již poměrně dlouho. Za prvního nositele této myšlenky a propagátora probiotických bakterií bývá považován ruský vědec Ilja Mečnikov. Probiotika lze charakterizovat jako živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele, pokud jsou podávány v přiměřeném množství [48]. Mezi mikroby s prokázanou probiotickou funkcí patří nejen bakterie mléčného kvašení (laktobacily, bifidobakterie), ale i jiné druhy bakterií (enterokoky, některé kmeny *Escherichia coli*) či některé kvasinky (např. *Saccharomyces boulardii*) [49–51]. Zatím je věnována poměrně malá pozornost specifickým vlastnostem jednotlivých probiotických mikrobů, kterými se od sebe často odlišují i jednotlivé kmeny či izoláty jednoho druhu [52]. Pro jednotlivé nemoci by se tedy měla využívat určitá funkčně definovaná probiotika [48]. Narůstající využití imunosupresivní terapie vede k úvahám o bezpečnosti podávání živých bakterií imunodeficientním jedincům. Zdá se, že v těchto případech by lyzáty bakterií nebo definované komponenty potenciálně prospěšných bakterií byly vhodnějším řešením [53,54].

Klinických studií, které by prokázaly jasný terapeutický efekt podávání probiotik u různých chorob, je zatím bohužel velmi málo. O to méně je pak ještě prací dokládajících schopnost mikrobů vzniku chorob aktivně předcházet. Přesto lze jmenovat alespoň příklady chorobných stavů (především gastrointestinálního traktu), kde léčebné nebo preventivní působení určitých probiotických bakterií bylo na více pracovištích klinickými studiemi jasně prokázáno: jsou to např. rotavirové průjmy, průjmy při antibiotické léčbě či pouchitida. Z dosavadních výsledků klinických studií se zdá, že probiotika mají jistý léčebný účinek u pacientů s ulcerózní kolitidou. U pacientů s Crohnovou chorobou však prospěšnost podávání probiotik přesvědčivě prokázána nebyla [55,56].

Využití probiotik je slibnou cestou i v léčbě pacientů s dráždivým tračníkem (irritable bowel syndrome – IBS). Ukázalo se, že některé látky produkované probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917 příznivě ovlivňují motilitu střeva zvýšením kontrakility buněk hladké svaloviny [57]. Zároveň tato bakterie indukuje tvorbu lidského β -defensinu 2 (antimikrobního peptidu), který chrání střevní sliznici před translokujícími mikroby, a tím zlepšuje bariérovou funkci střeva [58]. Látky produkované během růstu *Lactobacillus rhamnosus* GG chrání buňky hladké svaloviny střeva před ztrátou kontrakility způsobené lipopolysacharid (LPS) [59]. Přímý kontakt některých probiotik (např. *Lactobacillus acidophilus*) s epitelovými buňkami indukuje expresi opioidních a kanabinoidních receptorů u buněk střevní sliznice, a přispívá tak k modulaci vnímání viscerální bolesti [60]. U pacientů s celiakií se předpokládá, že komplementárně s dodržováním bezlepkové diety může podávání probiotik pomoci obnovit poškozenou střevní mikrobiotu, a tím snížit toxicitu gliadinu a následnou aktivaci imunitního systému. Není vyloučeno, že podávání probiotik může hrát roli i v primární prevenci u jedinců s vysokým rizikem vzniku celiakie. Lze očekávat, že teprve data z probíhajících klinických studií přinesou rozhodující odpověď o možnosti ovlivnění vývoje této choroby modifikací střevní mikrobioty. VSL#3, což je směs 8 probiotických mikrobů, je u NAFLD (non alcoholic fatty liver disease) zkoumán nejčastěji. Alisi et al. prokázali, že děti s NAFLD mají po 4 měsících léčby VSL#3 signifikantní nižší steatózu než děti kontrolní [61].

Problematika probiotik je umocněna faktem, že většina z nich je deklarována jako potravinové doplňky, pro které platí jiné regulační mechanismy než pro léky. Nelze dobře kontrolovat jejich výrobu a obsah některých probiotik v preparátu není přesně specifikován. Navíc je třeba efekt probiotik vztahovat ke konkrétnímu bakteriálnímu kmeni a jeho dávce. Účinek takového mikroba na určitou chorobu pak musí být ověřený pomocí klinické studie. Bohužel, takových studií je poměrně málo a poměrně často jsou jejich závěry limitované zařazením malého množství pacientů.

Nejnovejším směrem ve využití probiotických bakterií k léčbě střevních chorob je možnost přípravy a aplikace rekombinantních kmenů bakterií, které produkují biologicky aktivní molekuly např. cytokiny s protizánětlivým účinkem [62].

Antibiotika

Antibiotika nepochybně ovlivňují střevní mikrobiotu a jejich použití může být i kontraproduktivní. Dochází mimo jiné k rezistenci na tento typ léčby a ke vzniku onemocnění, které je spojeno s použitím antibiotik, jako je např. pseudomembranózní kolitida. Vztah mezi narušením normální gastrointestinální mikrobioty a antibiotickou terapií a vývojem infekce *Clostridium difficile* je jen jedním z příkladů potenciálních rizik dramaticky ovlivňujících střevní mikroprostředí. Na druhé straně antibiotika představují nejjednodušší a nejpřímější pří-

stup k manipulaci s intestinální mikrobiotou. V případě léčby dráždivého tračníku (IBS) vykazovaly studie s nevstřebatelnými antibiotiky pozitivní výsledky, recentně se zaměřily na používání rifaximinu. Metaanalýza publikovaná v roce 2012 ukázala, že rifaximin u pacientů s IBS byl účinnější než placebo při hodnocení globálních příznaků a nadýmání [63]. Ve studiích zkoumající efekt antibiotik (amoxicilin a vankomycin) na mikrobiotu u obězních nemocných bylo zjištěno, že vankomycin, ale ne již amoxicilin, vedl ke snížení bakteriální diverzity, ale 7denní podávání obou antibiotik nevedlo ke klinicky závažnému vlivu na metabolismus u obězních pacientů [64]. Antisteatotický účinek na játra byl prokázán u polymyxinu B, metronidazolu a rifaximinu. Lidskou mikrobiotu mohou negativně ovlivňovat i antibiotika použita ve veterinární medicíně, která se koncentrují v potravinách vyrobených z takto léčených zvířat. Nejenže se tímto způsobem může kontaminovat strava, ale sekundárně i vodní zdroje a půda.

Fekální mikrobiální transplantace

Patrně neúspěšnější metodou zahrnující terapeutickou manipulaci s mikrobiotou je fekální mikrobiální transplantace (FMT). FMT je léčebná metoda spočívající v přenosu stolice od zdravého dárce pacientovi, s níž lze obnovit mikrobiální homeostázu střeva. Stolica ze zdravých dárců obsahuje bohatý a komplexní sortiment mikroorganismů, které vyvinuly prospěšný, symbiotický vztah s lidským organizmem během milionů let evoluce. První zmínky o FMT se datují do doby před 2 000 let a pocházejí ze staré Číny. Ge Hong popisuje léčbu průjmů a otravy jídlem pomocí FMT [65]. První článek v odborné literatuře o úspěšném použití FMT k léčbě pseudomembranózní kolitidy byl publikován v roce 1958 Eisemanem et al. [66]. V posledních letech stoupla incidence infekce *Clostridium difficile*. Tato infekce patří obvykle mezi zoonózní nákazy s významnou morbiditou a mortalitou. Vzhledem k malému efektu antibiotické léčby se začala k léčbě pseudomembranózní kolitidy používat FMT od zdravých dárců a dosáhlo se překvapivě vysoké účinnosti [67]. FMT je dle současných znalostí vysoce efektivní v léčbě rekurentní pseudomembranózní kolitidy. V této indikaci se jedná dnes o standardní, klinicky využitelnou metodu. Principem léčby je napravení „ekologické katastrofy“ způsobené většinou použitím antibiotik s následným přemnožením kmene *Clostridium difficile*. Proto není překvapivé, že i jednorázové či dvojnásobné podání FMT vede k vysoké frekvenci vyléčení (81–94 %). Ostatní uvedené indikace (např. idiopatické střevní záněty, syndrom dráždivého tračníku, jaterní encefalopatie, diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndrom, NASH, obezita, ateroskleróza, idiopatická trombocytopenická purpura, roztroušená skleróza, alergie, autismus a další) jsou experimentální a jsou předmětem pouze klinických studií [68]. U pacientů s ulcerózní kolitidou byla po fekální transplantaci prokázána změna složení mikrobioty, u pacientů s diabetem bylo popsáno zlepšení některých parametrů diabetu 2. typu, jsou činěny pokusy o léčbu

obezity. Účinnost tohoto přístupu však u těchto chorob nebyla zatím prokázána, ale je možné předpokládat, že se v této oblasti brzy dočkáme zajímavých výsledků.

FMT je jednoduchá metoda, která však není dosud standardizovaná. V publikovaných studiích jsou velké rozdíly ve zpracování stolice, použitých rozpouštědlech i způsobu homogenizace a filtrace materiálu. Nejčastěji je filtrovaný koktejl asi 50 g čerstvé stolice dárce vpraven do těla příjemce nazogastrickou nebo nazojejunální sondou nebo kanylou při koloskopickém vyšetření, popřípadě formou klyzmatu. Výsledný produkt (fekální transplantát) se nejčastěji užívá čerstvý, nebo ho lze uchovat hluboce zmražený s glycerolem či lyofilizací k pozdějšímu použití. V poslední době došlo i ke vzniku fekálních dárcovských bank, které shromažďují zmraženou či lyofilizovanou stolicí od kvalitních dárců. Tento přístup umožňuje širší využití FMT v klinické praxi. Dalším logickým krokem je příprava kapslí s lyofilizovaným či speciálně emulgovaným fekálním obsahem. K zajištění přesunu adekvátní kvantity mikrobioty je však nutno aplikovat najednou velké množství kapslí.

Důležitým aspektem je volba dárce, který představuje stěžejní problém FMT. Otázkou je, ale jak identifikovat ideálního dárce. V této otázce je prováděn intenzivní výzkum, dosud však jen s omezenými výsledky. Správná volba dárce je důležitá jak z hlediska bezpečnosti, tak i efektivity FMT. Největším rizikem FMT je přenos infekce, proto musí být dárci pečlivě vyšetřeni. Stejně jako u orgánových transplantací jsou doporučována poměrně rozsáhlá anamnestická, serologická a kultivační vyšetření. Pečlivé vyšetření dárce tudíž představuje nemalou finanční zátěž FMT. FMT je ale při dodržení přísných podmínek vyšetření dárce považována za bezpečnou metodu. Většina pacientů léčená FMT popisuje přechodný průjem nebo zácpu, bolesti a křeče břicha. U IBD pacientů jsou častěji zaznamenávány horečky a krátkodobá elevace zánětlivých parametrů, což nejspíše souvisí s porušenou bariérovou funkcí střevní sliznice. Principem účinku FMT je navození změny stávající mikrobioty. U nemocných s pseudomembranózní kolitidou postačí jednorázová nebo maximálně jednou opakovaná léčba FMT. U ostatních indikací však nejspíše budou nutné opakované a nelze vyloučit, že i dlouhodobé podání FMT.

Autoři jsou podporováni granty Agentury pro zdravotnický výzkum (15–28064A a 16–27449A) a Grantové agentury ČR (16–063265).

Literatura

- Gill SR, Pop M, Deboy RT et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312(5778): 1355–1359. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1124234>>.
- Columpsi P, Sacchi P, Zuccaro V et al. Beyond the gut bacterial microbiota: The gut virome. *J Med Virol* 2016; 88(9): 1467–1472. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24508>>.
- Qin J, Li R, Raes J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464(7285): 59–65. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08821>>.
- Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* 2013; 8(6): e66019. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066019>>.
- Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(5): 1046S–1051S. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1046s>>.
- Kozakova H, Kolinska J, Lajda Z et al. Effect of bacterial monoassociation on brush-border enzyme activities in ex-germ-free piglets: comparison of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains. *Microbes Infect* 2006; 8(11): 2629–2639. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.008>>.
- Taskalova-Hogenova H, Sterzl J, Stěpánková R et al. Development of immunological capacity under germfree and conventional conditions. *Ann NY Acad Sci* 1983; 409: 96–113.
- [Human Microbiome Project Consortium]. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486(7402): 207–214. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11234>>.
- Costello EK, Lauber CL, Hamady M et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009; 326(5960): 1694–1697. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1177486>>.
- Thaiss CA, Zeevi D, Levy M et al. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* 2014; 159(3): 514–529. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.048>>.
- Wang Y, Kuang Z, Yu X et al. The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. *Science* 2017; 357(6354): 912–916. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.aan0677>>.
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C et al. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156(pt 11): 3216–3223. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.040618-0>>.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012; 148(6): 1258–1270. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>>.
- O'Toole PW, Jeffery IB. Gut microbiota and aging. *Science* 2015; 350(6265): 1214–1215. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.aac8469>>.
- Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 2014; 158(5): 1000–1010. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.006>>.
- Shulzhenko N, Morgun A, Hsiao W et al. Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nat Med* 2011; 17(12): 1585–1593. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2505>>.
- Bevins CL, Salzman NH. The potter's wheel: the host's role in sculpting its microbiota. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(22): 3675–3685. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-011-0830-3>>.
- de Vos WM, de Vos EA. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr Rev* 2012; 70(Suppl 1): S45–S56. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00505.x>>.
- Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Front Microbiol* 2016; 7: 455. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00455>>.
- McLean MH, Dieguez D Jr, Miller LM et al. Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? *Gut* 2015; 64(2): 332–341. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308514>>.
- Duboc H, Rajca S, Rainteau D et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013; 62(4): 531–539. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302578>>.
- Wu N, Yang X, Zhang R et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol* 2013; 66(2): 462–470. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-013-0245-9>>.

23. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13(10): 701–712. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3346>>.
24. Kverka M, Tlaskalova-Hogenova H. Intestinal Microbiota: Facts and Fiction. *Dig Dis* 2017; 35(1–2): 139–147. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1159/000449095>>.
25. Rampelli S, Schnorr SL, Consolandi C et al. Metagenome Sequencing of the Hadza Hunter-Gatherer Gut Microbiota. *Curr Biol* 2015; 25(13): 1682–1693. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.055>>.
26. Bajer L, Kverka M, Kostovcik M et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2017; 23(25): 4548–4558. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i25.4548>>.
27. Jia W, Xie G, Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018; 15(2): 111–128. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.119>>.
28. Morgan XC, Huttenhower C. Meta-omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology* 2014; 146(6): 1437–1448. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.049>>.
29. Tlaskalova-Hogenova H et al. Chapter 8 – Gnotobiology and the Study of Complex Interactions between the Intestinal Microbiota, Probiotics, and the Host. In: Mestecky J, Strober W, Russel MW (eds), *Mucosal Immunology*. 4th ed. Academic Press: Boston 2015: 109–133. ISBN 978-0124158474.
30. Stepankova R, Powrie F, Kofronova O et al. Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13(10): 1202–1211. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20221>>.
31. Dalhoff A. Differences between bacteria grown in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 1985; 15(Suppl A): 175–195.
32. Marteyn B, Gazi A, Sansonetti P. Shigella: a model of virulence regulation in vivo. *Gut Microbes* 2012; 3(2): 104–120. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4161/gmic.19325>>.
33. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(33): 14691–14696. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005963107>>.
34. Marchesi JR, Adams DH, Fava F et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016; 65(2): 330–339. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>>.
35. Sabino J, Vieira-Silva S, Machiels K et al. Therapeutic Manipulation of the Gut Microbiota Through Diet to Reduce Intestinal Inflammation: Results from the FIT Trial. *Gastroenterology* 2017; 152(5 Suppl 1): S1. Dostupné z DOI: <[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(17\)30385-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(17)30385-2)>.
36. Nanayakkara WS, Skidmore PM, O'Brien L et al. Efficacy of the low FODMAP diet for treating irritable bowel syndrome: the evidence to date. *Clin Exp Gastroenterol* 2016; 9: 131–142. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2147/CEG.S86798>>.
37. Tlaskalova-Hogenova H, Vannucci L, Klimesova K et al. Microbiome and colorectal carcinoma: insights from germ-free and conventional animal models. *Cancer J* 2014; 20(3): 217–224. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/PP0.0000000000000052>>.
38. Gagniere J, Raisch J, Veizant J et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(2): 501–518. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501>>.
39. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013; 504(7480): 446–450. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature12721>>. Erratum in *Nature* 2014; 506(7487): 254.
40. Smith PM, Howitt MR, Panikov N et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013; 341(6145): 569–573. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1241165>>.
41. Perry RJ, Peng L, Barry NA et al. Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* 2016; 534(7606): 213–217. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature18309>>.
42. Vieira AT, Fukumori C, Ferreira CM. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clin Transl Immunology* 2016; 5(6): e87. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/cti.2016.38>>.
43. Lewis S, Burmeister S, Brazier J. Effect of the prebiotic oligofructose on relapse of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a randomized, controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3(5): 442–448.
44. Collins J, Robinson C, Danhof H et al. Dietary trehalose enhances virulence of epidemic *Clostridium difficile*. *Nature* 2018; 553(7688): 291–294. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature25178>>.
45. Wong C, Harris PJ, Ferguson LR. Potential Benefits of Dietary Fibre Intervention in Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci* 2016; 17(6): pii: E919. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms17060919>>.
46. Dauboul CA, Horsmans Y, Lambert P et al. Effects of oligofructose on glucose and lipid metabolism in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59(5): 723–726. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602127>>.
47. Tran J, Wilson K, Plebanski M et al. Manipulating the microbiota to improve human health throughout life. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2017; 111(9): 379–381. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trx068>>.
48. FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization: Cordoba (Argentina).
49. Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2016; 30(1): 17–25. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2015.12.001>>.
50. Dinleyici EC, Kara A, Dalgic N et al. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 reduces the duration of diarrhoea, length of emergency care and hospital stay in children with acute diarrhoea. *Benef Microbes* 2015; 6(4): 415–421. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3920/BM2014.0086>>.
51. Wells JM, Rossi O, Meijerink M et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(Suppl 1): 4607–4614. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1000092107>>.
52. Spinler JK, Sontakke A, Hollister EB et al. From prediction to function using evolutionary genomics: human-specific ecotypes of *Lactobacillus reuteri* have diverse probiotic functions. *Genome Biol Evol* 2014; 6(7): 1772–1789. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evu137>>.
53. Zakostelska Z, Kverka M, Klimesova K et al. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One* 2011; 6(11): e27961. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027961>>.
54. Quevraïn E, Maubert MA, Michon C et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 2016; 65(3): 415–425. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>>.
55. Fric P. Probiotics in gastroenterology. *Z Gastroenterol*. 2002; 40(3): 197–201. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-2002-22328>>.
56. Hansen JJ, Sartor RB. Therapeutic Manipulation of the Microbiome in IBD: Current Results and Future Approaches. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2015; 13(11): 105–120. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11938-014-0042-7>>.
57. Bar F, Von Koschitzky H, Roblick U et al. Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an in vitro organ bath study. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21(5): 559–566. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01258.x>>.
58. Mondel M, Schroeder BO, Zimmermann K et al. Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunol* 2009; 2(2): 166–172. <<http://dx.doi.org/10.1038/mi.2008.77>>.

59. Ciceria A, Santangelo F, Gambardella L et al. Protective Role of Postbiotic Mediators Secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG Versus Lipopolysaccharide-induced Damage in Human Colonic Smooth Muscle Cells. *J Clin Gastroenterol* 2016; 50(Suppl 2): Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13–15, 2015: S140–S144. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MCG.0000000000000681>>.
60. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A et al. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med* 2007; 13(1): 35–37. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm1521>>.
61. Alisi A, Bedogni G, Baviera G et al. Randomised clinical trial: The beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39(11): 1276–1285. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/apt.12758>>.
62. Braat H, Rottiers P, Hommes DW et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(6): 754–759. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2006.03.028>>.
63. Menees SB, Maneerattannaporn M, Kim HM et al. The efficacy and safety of rifaximin for the irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2012; 107(1): 28–35; quiz 36. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2011.355>>.
64. Reijnders D, Goossens GH, Hermes GD et al. Effects of Gut Microbiota Manipulation by Antibiotics on Host Metabolism in Obese Humans: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Cell Metab* 2016; 24(1): 63–74. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.016>>.
65. Zhang F, Luo W, Shi Y et al. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1755; author reply p.1755–6. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2012.251>>.
66. Eiseman B, Silen W, Bascom GS et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 1958; 44(5): 854–859.
67. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013; 368(5): 407–415. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1205037>>.
68. Březina J, Bajer L, Špičák J et al. Fekální mikrobiální transplantace u idiopatických střevních zánětů. *Gastroent Hepatol* 2016; 70(1): 51–56.

doc. MUDr. Pavel Drastich, Ph.D.

✉ padr@ikem.cz

Klinika hepatogastroenterologie IKEM, Praha

www.ikem.cz




Doručeno do redakce: 4. 2. 2018

Přijato po recenzi: 18. 4. 2018

PUBLIKACE 4

Article

Inflammatory Bowel Disease Types Differ in Markers of Inflammation, Gut Barrier and in Specific Anti-Bacterial Response

Stepan Coufal ¹ , Natalie Galanova ¹, Lukas Bajer ^{1,2} , Zuzana Gajdarova ¹, Dagmar Schierova ^{1,3}, Zuzana Jiraskova Zakostelska ¹, Klara Kostovcikova ¹, Zuzana Jackova ¹, Zuzana Stehlikova ¹, Pavel Drastich ², Helena Tlaskalova-Hogenova ¹ and Miloslav Kverka ^{1,4,*} 

¹ Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

² Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague, Czech Republic

³ Institute of Animal Physiology and Genetics of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

⁴ Institute of Experimental Medicine of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

* Correspondence: kverka@biomed.cas.cz; Tel.: +420-24106-2452

Received: 14 June 2019; Accepted: 11 July 2019; Published: 13 July 2019



Abstract: Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC) and inflammatory bowel disease (IBD) associated with primary sclerosing cholangitis (PSC-IBD), share three major pathogenetic mechanisms of inflammatory bowel disease (IBD)-gut dysbiosis, gut barrier failure and immune system dysregulation. While clinical differences among them are well known, the underlying mechanisms are less explored. To gain an insight into the IBD pathogenesis and to find a specific biomarker pattern for each of them, we used protein array, ELISA and flow cytometry to analyze serum biomarkers and specific anti-microbial B and T cell responses to the gut commensals. We found that decrease in matrix metalloproteinase (MMP)-9 and increase in MMP-14 are the strongest factors discriminating IBD patients from healthy subjects and that PSC-IBD patients have higher levels of Mannan-binding lectin, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), CD14 and osteoprotegerin than patients with UC. Moreover, we found that low transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is associated with disease relapse and low osteoprotegerin with anti-tumor necrosis factor- α (TNF- α) therapy. Patients with CD have significantly decreased antibody and increased T cell response mainly to genera *Eubacterium*, *Faecalibacterium* and *Bacteroides*. These results stress the importance of the gut barrier function and immune response to commensal bacteria and point at the specific differences in pathogenesis of PSC-IBD, UC and CD.

Keywords: inflammatory bowel disease; biomarkers; gut barrier; microbiota; antibodies; T cells

1. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD), i.e., Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are severe chronic inflammatory illnesses of the gastrointestinal tract, affecting more than 0.3% of the people in many countries [1]. Although their etiology and pathogenesis is not fully understood, it is generally accepted that the inflammation results from an aberrant immune response to antigens of resident gut microbiota in genetically susceptible individuals [2]. Moreover, primary sclerosing cholangitis (PSC), chronic liver disorder characterized by inflammation and stenosis of the bile ducts, with concomitant IBD (PSC-IBD) has recently emerged as another form of IBD [3]. Despite the well-established headlines in IBD therapy, discontinuation of pharmacological intervention due to the inefficiency or adverse events is still common in all types of IBD therapy [4–6]. Ability to predict the disease relapses and

complications or suggest the ideal therapy for a particular patient during the time of diagnosis is a worthy goal of IBD diagnostics. Taking into account the complex and intertwined pathogenesis together with distinct forms of IBD, studies of those mechanisms may yield suitable biomarkers. Three major mechanisms are involved in IBD pathogenesis, gut microbiota dysbiosis, gut barrier failure and dysregulation of the immune system.

In humans, gut microbiota represents a complex ecosystem that consists of more than 1000 species of bacteria, five genera of Archaea, 66 genera of fungi and an ill-defined number of viruses, mostly bacteriophages [7–9]. The gnotobiotic (i.e., germ-free or artificially colonized animals) studies clearly showed that without this complex ecosystem, the immune system and many other physiological functions would never reach their full potential [10]. While gut microbiota cannot induce intestinal inflammation on its own [11], imbalances in intestinal microbiota (i.e., dysbiosis), or the presence of commensal bacteria with increased virulence in IBD patients, could cause excessive anti-microbial immune response [12–15]. It is still unclear, however, if these microbial perturbances in IBD are cause, consequence or just a confounding factor [16].

The gut barrier is a complex apparatus consisting of a mucus layer, a tightly connected epithelium supported by mucosal immune cells and their products that protect an organism's integrity [17]. Disruption of this barrier (defects of the epithelial continuity) increases its permeability allowing the excessive contact of the luminal antigens with the immune cells, which is one of the key steps in pathogenesis of IBD and several other diseases [18]. The gut barrier disruption is responsible for many IBD symptoms even during the mucosal healing [19]. Both UC and CD patients with an active disease have severe impairment of this barrier on multiple levels [20,21]. Several noninvasive biomarkers of gut barrier failure were suggested. Since both Intestinal and Liver Fatty Acid-Binding Proteins (I-FABP, L-FABP) reflect gut epithelium damage, they were previously successfully used as early biomarkers for severe neonatal emergencies, such as necrotizing enterocolitis or gastroschisis [22–24]. Because the matrix metalloproteinase (MMP) system has an important role in the gut barrier remodeling, both fecal and serum MMP-9 levels were suggested as promising biomarkers of gut barrier health [25,26].

The impairment of host–microbe interactions in IBD pathogenesis is supported by genome-wide association studies, which identified an association of IBD with multiple polymorphisms in genes encoding regulation of immune processes including the recognition, processing and killing of microorganisms [27,28]. Disruption of regulatory T cell functions and impairment of the mucosal immune response to normal microbiota play a crucial role in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation [29]. Although the typical T helper (Th)1 and Th17 response is associated with CD pathogenesis, the presence of antibodies to some microbial constituents in sera of patients suggests a much broader spectrum of immune reactions in IBD [30].

The diagnosis of IBD and its clinical staging is still based mainly on the patient's history and medical examination, where endoscopy plays a major part. Several serological tests were proposed to improve the IBD diagnostics and some of them showed promising predictive value. The anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCAs) reacting to the mannan protein in the *Saccharomyces cerevisiae* are significantly increased and highly specific for CD patients even if they have clinical remission and the perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) are increased in UC patients [31–33]. Apart from ASCA, serum antibodies to other microbial antigens were not only a source of potential biomarkers for IBD diagnosis and differential diagnosis, but also suggested the importance of anti-microbial response in IBD pathogenesis. These biomarkers included *Escherichia coli* outer membrane porin C (anti-OmpC), anti-flagellin (anti-Cbir1) [34] and the anti-I2 component of *Pseudomonas fluorescens* (anti-I2) [35]. Other biomarkers, such as serum and fecal calprotectin, fecal lactoferrin, S100A12, Lipocalin-2, showed promising results in relapse prediction. However, the utility of these markers in daily clinical practice is still rather low [36–38].

In this study, we performed broad analysis of serum and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) biomarkers, including chemokines, cytokines, specific antibodies and specific anti-microbial

T cell reactivity to gain an insight into the IBD pathogenesis and to find biomarker pattern specific for each form of IBD.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

All individuals were recruited from the patients admitted to the Hepatogastroenterology Department of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM), Prague, Czech Republic, between May 2015 and December 2018. In total, we enrolled 119 patients with different forms of IBD; CD, UC and PSC-IBD and 28 healthy individuals served as controls (HC) (Table 1). Since CD can involve different parts of gastrointestinal tract, all IBD patients had colonic involvement to minimize the variability. Serum was aliquoted and stored at -20°C until analyses.

Table 1. Clinical characteristics of the study participants. CD: Crohn's disease; HC: healthy control; PSC: primary sclerosing cholangitis; UC: ulcerative colitis.

	HC <i>n</i> = 28	PSC <i>n</i> = 47	UC <i>n</i> = 52	CD <i>n</i> = 20
Age (mean \pm SD; years)	42.5 \pm 10.5	38.0 \pm 11.6	39.7 \pm 9.8	33.5 \pm 7.8
Sex (% of males)	53.6; 15/13	74.5; 35/12	53.9; 28/24	45.0; 9/11
Activity (% of active)	0.0	14.0	26.9	20.0
Extent of intestinal inflammation				
none (%; <i>n</i>)	100.0; 28	12.8; 6	0.0; 0	0.0; 0
partial (%; <i>n</i>)	0.0; 0	10.6; 5	38.4; 20	45.0; 9
pancolitis (%; <i>n</i>)	0.0; 0	72.3; 34	61.5; 32	50.0; 10
Therapy				
Mesalazine (5-ASA) (%; <i>n</i>)	0.0; 0	70.2; 33	92.3; 48	85.0; 17
Glucocorticoids (%; <i>n</i>)	0.0; 0	38.3; 18	21.2; 11	15.0; 3
Azathioprine (AZA) (%; <i>n</i>)	0.0; 0	31.9; 15	40.4; 21	35.0; 7
Anti-TNF- α (%; <i>n</i>)	0.0; 0	0.0; 0	38.5; 20	45.0; 9
<i>E. coli</i> Nissle 1917 (%; <i>n</i>)	0.0; 0	8.5; 4	23.1; 12	20.0; 4

2.2. Antibody Array Assay for Serum Biomarkers

A training set of 18 samples, six each of HC, UC and CD, was assayed for the relative amount of 507 human proteins using RayBio Label-Based (L-Series) Human Antibody Array L-507 according to the manufacturer's protocol (RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA). The target proteins included cytokines, chemokines, adipokines, growth factors, angiogenic factors, proteases, soluble receptors and soluble adhesion molecules. The signals were scanned at a wavelength of 532 nm using GeneTAC UC4 Microarray Scanner (Genomic Solution, United Kingdom; resolution, 10 μm), and the resulting image was analyzed and processed in AG Scan software (ver. 18.7. 2007, The GenoToul bioinformatics, France) [39]. To compare the median fluorescence intensity (MFI) values, we subtracted the background staining and normalized the data to the positive control MFI average for all arrays, and then transformed to z-scores for each protein. The classifiers for HC, UC and CD were analyzed by nearest shrunken centroid method by Prediction Analysis of Microarrays (PAM; ver. 1.56) package for R (ver. 3.5.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [40].

2.3. ELISA for Serum Biomarkers

Next, we selected several biomarkers found by microarray profiling and several other, proposed markers and quantified them in the serum by ELISA (Table 2). Due to the limited amount of sample, not all samples were analyzed for all biomarkers.

Table 2. List of biomarkers quantified in sera of inflammatory bowel disease (IBD) patients and healthy subjects.

Biomarker	Abbreviation	Manufacturer	Cat. No
Endocrine-Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor *	EG-VEGF	R&D systems	DY1209
Interleukin-8 receptor, alpha *	CXCR1/IL8RA	LifeSpan BioScience	LS-F11255
Osteoprotegerin	OPG	R&D systems	DY805
Tomoregulin 1	TMEFF1	LifeSpan BioScience	LS-F52730
Insulin-like Growth Factor 2 *	IGF2	R&D systems	DY292
Transforming Growth Factor- β 1 *	TGF- β 1	R&D systems	DY240
TROY protein	TNFRSF19	LifeSpan BioScience	LS-F39966
Roundabout Guidance Receptor 4 *	ROBO4	RayBiotech	ELH-ROBO4
Matrix Metalloproteinase 9	MMP-9	R&D systems	DY911
Matrix Metalloproteinase 14	MMP-14	R&D systems	DY918
Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1	TIMP-1	R&D systems	DY970
Mannan-Binding Lectin	MBL	R&D systems	DY2307
Soluble CD14	CD14	R&D systems	DY383
Lipopolysaccharide-Binding Protein	LBP	R&D systems	DY870
Trefoil Factor 3	TFF-3	R&D systems	DY4407
Endotoxin-Core Antibody IgM	EndoCab	MyBiosource	MBS9352896
Serum Amyloid A	SAA	HyCult Biotech	HK333
Pre-haptoglobin 2	Zonulin	MyBiosource	MBS2880564
D-amino-acid oxidase	DAAO	MyBiosource	MBS2886321
Intestinal Fatty Acid-Binding Protein	I-FABP	HyCult Biotech	HK406
Liver Fatty Acid-Binding Protein	L-FABP	HyCult Biotech	HK404

* Identified by the array.

2.4. Bacterial Antigen Preparation

We selected typical representatives of healthy Czech gut microbiota, using data from our previous study [41]. Different bacteria were cultured in their respective optimal media for 24 h at 37 °C (Table S1). Fresh bacterial culture was centrifuged, pellets were washed in sterile water (B. Braun Medical, Prague, Czech Republic) and inactivated by French press (French Pressure Cell Press Model FA-078, SLM Instruments) at 1500 psig, the pressurizing procedure was repeated three times. Samples were freeze dried in a lyophilizer (Lyovac GT 2, Leybold Heraeus) and stored in aliquots at -28 °C until analyses. The following bacterial strains were used for PBMCs stimulation or for antigen coating in indirect ELISA: *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia coccoides*, *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella ruminicola* and *Escherichia coli*.

2.5. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque Plus (GE-Healthcare; Cat# 17-1440-03) density gradient centrifugation ($740 \times g$, 30 min, room temperature (RT), brake OFF) from heparinized blood and stored at -150 °C using freeze-thaw method optimized for maximum viability [42]. Briefly, after the collection the cells were washed in sterile pre-warmed phosphate-buffered saline (PBS) ($330 \times g$, 10 min, RT), re-suspended in pre-warmed Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (Sigma-Aldrich; Cat# R0883), counted and re-suspended at 20×10^6 /mL live cells in RPMI containing 60% Fetal calf serum (FCS; Biochrom GmbH, Germany; Cat# S 0115). Next, the equal volume of pre-warmed mixture of 80% FCS and 20% DMSO (Sigma-Aldrich; Cat# D 2650) was gently added drop wise with gentle shaking after each drop to equalize the cryopreservant. After the 5 min incubation (RT), cells were aliquoted to cryovials and gently frozen in a Mr. Frosty Freezing Container (Thermo Fisher Scientific; Cat# 5100-0001) at -80 °C. After 12–48 h,

cells were transferred to -150°C for long term storage until analyses. For thawing cryotubes were placed in a 37°C water bath for 8 min, then transferred to a 15 mL tube, diluted drop wise with 8 mL of pre-warmed RPMI medium, centrifuged ($300 \times g$, 5 min, RT) and the supernatant was discarded. After another washing step, the cells were counted using Trypan blue exclusion and diluted to 2×10^6 /mL live cells. Cells were then transferred to sterile 96U-well tissue culture plate (TPP, Trasadingen, Switzerland; Cat# 92197) at 100 μL /well in complete RPMI medium containing 10% FCS, 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich; Cat# P 0781) and 1% L-glutamine solution (Sigma-Aldrich; Cat# 1.00289) and placed into the humidified incubator (37°C , 5% CO_2) for 2 h before the stimulation. Next, 100 μL /well of the stimulus was added and the cells were incubated under similar conditions for another 14 h. The final concentration of microbial lysate was 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *Staphylococcus aureus* toxin B (SEB; Sigma-Aldrich; Cat# S 4881) served as a positive control.

2.6. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

The serum concentrations of anti-bacterial antibodies in Immunoglobulin M (IgM), Immunoglobulin G (IgG) and Immunoglobulin A (IgA) isotypes were analyzed by in-house developed indirect ELISA. Bacterial lysates, were dissolved in phosphate buffered saline (PBS) and incubated at 0.1 mg/mL (*Prevotella*, *Ruminococcus* and *Bacteroides*), 0.5 mg/mL (*Faecalibacterium*) or 1 mg/mL overnight in the 96F-well plate (NUNC Maxisorp; Cat# 442404). Optimal concentration of the coated lysates was extensively tested with sera of HC and IBD patients, but there were no major differences between 0.1 and 5 mg/mL for most lysates. Next, plates were washed with 1xPBS containing 0.05% Tween[®] 20 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Each well was blocked with 1% Bovine Serum Albumin (BSA; Merck) for 1 h. After the washing procedure, patient serum samples were applied in appropriate dilution. After 2 h of incubation plates were washed and corresponding secondary antibody (Peroxidase-conjugated AffinniPure F(ab')₂ fragment goat anti-human Fc fragment specific; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Ely, UK; Cat# 109-036-170, 109-036-011 or 109-036-129) was added and incubated 1 h in the dark. After washing, substrate solution was added and plates were incubated for 5 min in the dark. Absorbance was measured at 450 nm and 650 nm by spectrophotometer (Multiskan Ascent Plate Reader 96/384, MTX Lab Systems). Selected serum sample was used on all plates to serve as a standard. Its serial dilutions were used for the antibody response quantification with optical density (OD) at 1:200 defined as 1000 arbitrary units (AU).

2.7. Flow Cytometry Analysis (FACS)

Cells were stained with the Fixable Viability Dye eFlour 780 (eBioscience, San Diego, CA, USA; Cat# 65-0865-18) and following fluorescently labeled monoclonal antibodies: Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-human CD3 Antibody (UCHT1; Biolegend, San Diego, CA, USA; Cat# 300452), Qdot 605 anti-human CD4 Antibody (S3.5; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Cat# Q 1008), Alexa Flour 700 anti-human CD8 Antibody (SK1; Biolegend; Cat# 344724), Brilliant Violet 711 anti-human Interleukin (IL)-17A Antibody (BL168; Biolegend; Cat# 521327), Allophycocyanin (APC) anti-human IL-4 Antibody (8DE-8; eBioscience, Cat# 17-7049-81), Brilliant Violet 510 anti-human Tumor necrosis factor- α (TNF- α) Antibody (Biolegend; Cat# 502949), Phycoerythrin (PE) anti-human Interferon- γ (IFN- γ) Antibody (4S.B3; eBioscience; Cat# 12-7319-81), PE-Cyanine7 IL-2 Antibody (MQ1-17H12; eBioscience; Cat# 25-7029-41), Brilliant Violet 421 anti-human CD154 (24-31; Biolegend; Cat# 310 824).

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 14 h with Staphylococcal enterotoxin B from *Staphylococcus aureus* (final concentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Merck) or with corresponding bacterial lysates (final concentration 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Brefeldin A (final concentration 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, eBioscience) and Monensin (final concentration 2 μM , eBioscience) were added and after 4 h the cells were stained with Fixable Viability Dye, fixed with Intracellular (IC) Fixation Buffer (Invitrogen), and stained for cytokines in Permeabilization Buffer (Invitrogen). Gating on CD154 (CD40 ligand) was combined with intracellular cytokine analysis to focus on activated memory T helper cells as described previously [43].

Human Fc- γ receptor (FcR) Binding Inhibitor Purified (eBioscience) was used for inhibition of the non-specific FcR-mediated binding of monoclonal antibodies. UltraComp eBeads Compensation Beads (Invitrogen) were used for compensations. Cells were analyzed on FACS LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data were analyzed with FlowJo (version 7.2.5., Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

2.8. Ethics Statement

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of Institute of Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital (G 14-08-45).

2.9. Statistical Analysis

Non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test was used to compare multiple experimental groups and the Mann–Whitney test was used to compare two experimental groups. Non-parametric paired Friedman test with Dunn’s multiple comparison test was used to compare the CD154 expression after the cultivation with different microbial antigens with CD154 expression in non-stimulated sample. The data are presented as the median \pm 95% confidence interval and differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. GraphPad Prism statistical software (version 8.1.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for analyses.

Regression analysis was performed in R and the effect of each biomarker on Akaike information criterion (AIC) was determined in the nnet package (ver. 7.3-12). Next, we performed both backward elimination and forward selection based on AIC to determine the best regression model to discriminate between the two states. The composite receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed and their area under the curve (AUC) was calculated using ROCR package (ver. 1.0-7).

Hierarchical clustering was performed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) and the heatmap.plus (ver. 1.3) package for R.

3. Results

3.1. Healthy Subjects, CD and UC Patients Each Have a Distinct Cytokine Signature in Human Serum

Using the nearest shrunken centroid method, we searched for typical patterns of serum proteins that could differentiate between HC, CD and UC (Figure 1A). Subsequent cluster analysis of these proteins showed good separation of HC from IBD patients and their separation between UC and CD (Figure 1B). When the training set of patients (HC = 9, UC = 9 and CD = 10) was analyzed by ELISA, the ability to classify was only marginal, with osteoprotegerin (OPG) having the strongest effect. Both tomoregulin 1 (TMEFF1) and roundabout guidance receptor 4 (ROBO4) had only a negligible role on the HC vs. IBD classification (AUC = 0.785) and OPG was the strongest discriminating factor. In these cases, ELISA was in agreement with the protein array, with OPG being increased in CD and endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) in UC, but neither difference was statistically significant.

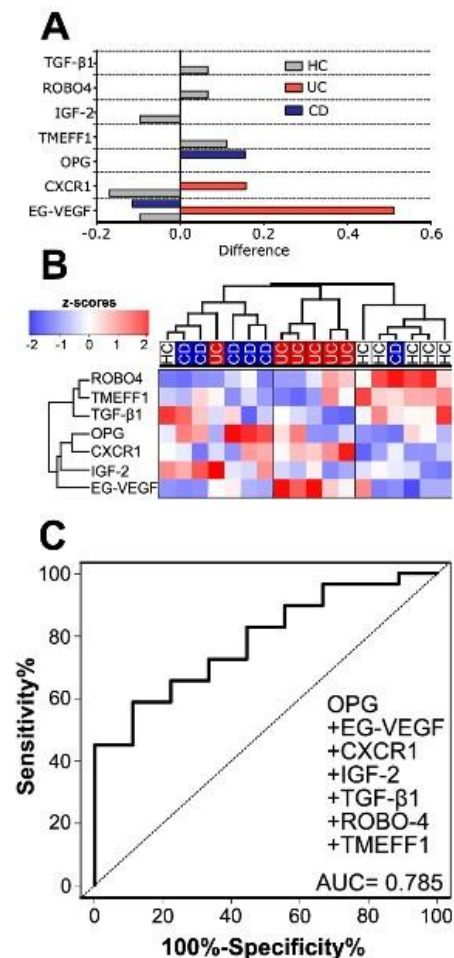


Figure 1. HC can be easily distinguished from IBD by only seven proteins, but separation of UC and CD is not as clear: (A) Shrunk differences for the seven differently abundant proteins in sera; (B) Heat map and cluster analysis of the chosen proteins. “HC” healthy controls, “UC” ulcerative colitis, “CD” Crohn’s disease.; (C) Composite receiver operating characteristic (ROC) curve for the seven proteins analyzed by ELISA with the training set of samples HC ($n = 10$) and IBD patients consisting of UC ($n = 9$), CD ($n = 10$) and PSC-IBD ($n = 10$).

3.2. Validation of Microarray Data by ELISA

Next, we analyzed the predictive value of these potential serum biomarkers using ELISA. Moreover, we selected other serum biomarkers of the gut barrier (MMP-9, MMP-14, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), zonulin, I-FABP, L-FABP and trefoil factor 3 (TFF-3)) or inflammation (mannan-binding lectin (MBL), CD14, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), EndoCab, serum amyloid A (SAA), D-amino-acid oxidase (DAAO) and TNF receptor superfamily member 19 (TNFRSF19) that may be involved as well. This analysis was performed in a larger cohort of patients including patients with UC, CD and PSC-IBD. We focused on the analysis of disease type, presence of the complications, disease activity, extent and localization. Except for some patient’s samples, both interleukin-8 receptor, alpha (CXCR1) and TNFRSF19 were below the detection limit of 195 ng/mL and

781 pg/mL, respectively. First, we found that many of these biomarkers are significantly increased in PSC-IBD patients. Except for the significant increase in TIMP-1 in CD, none of the other groups differed significantly from healthy controls (Figure S1), but the proteins from the MMP system (MMP-9, MMP-14 and TIMP-1) were the strongest discriminating factor in all forms of IBD (Figure 2B,C). Decreased serum concentration of OPG is typical for UC, as compared to CD and PSC-IBD (Figure 3), but while LBP was the strongest predictor of them all (AUC = 0.663), neither serum biomarker was capable to predict extent of colitis well (Figure S2).

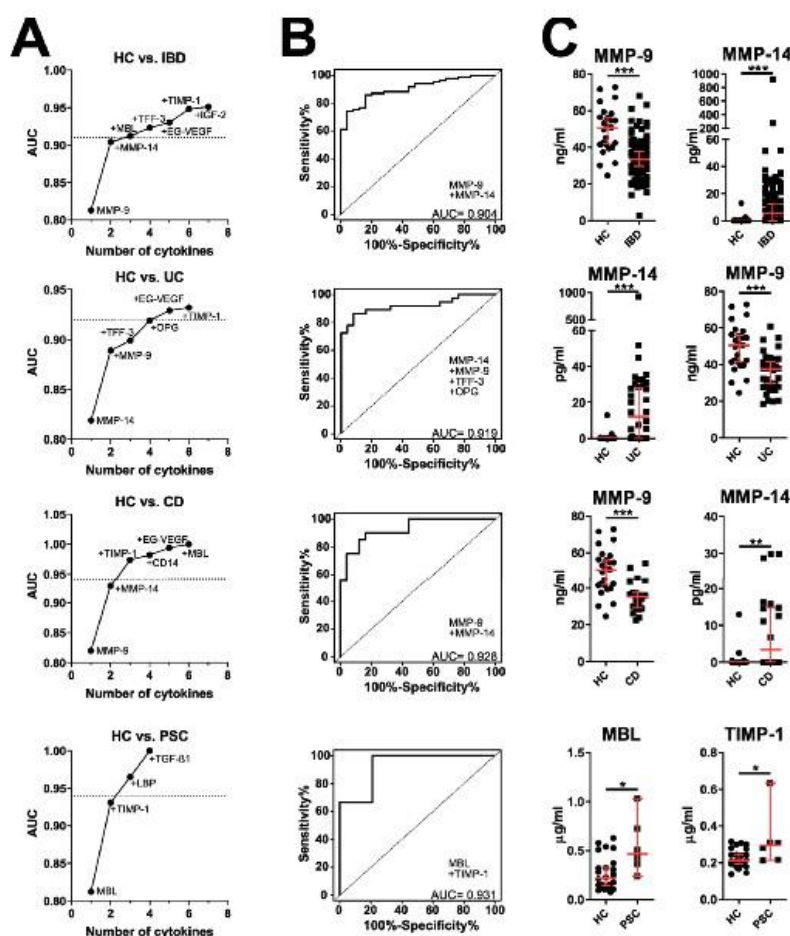


Figure 2. Cytokine patterns discriminating different forms of IBD from healthy controls. (A) Relative importance for each cytokine for the AUC increment within the best model found by regression analysis and (B) composite ROC curve analysis with the reliable discriminating power (AUC > 0.9). (C) Quantitative plot of the two most efficient discriminating factors analyzed by Mann Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Full quantitative comparison across all types of IBD is in Figure S1. Healthy controls (HC, $n = 25$), IBD patients ($n = 85$), UC patients ($n = 36$), CD patients ($n = 20$), PSC patients without concomitant IBD (PSC; $n = 6$).

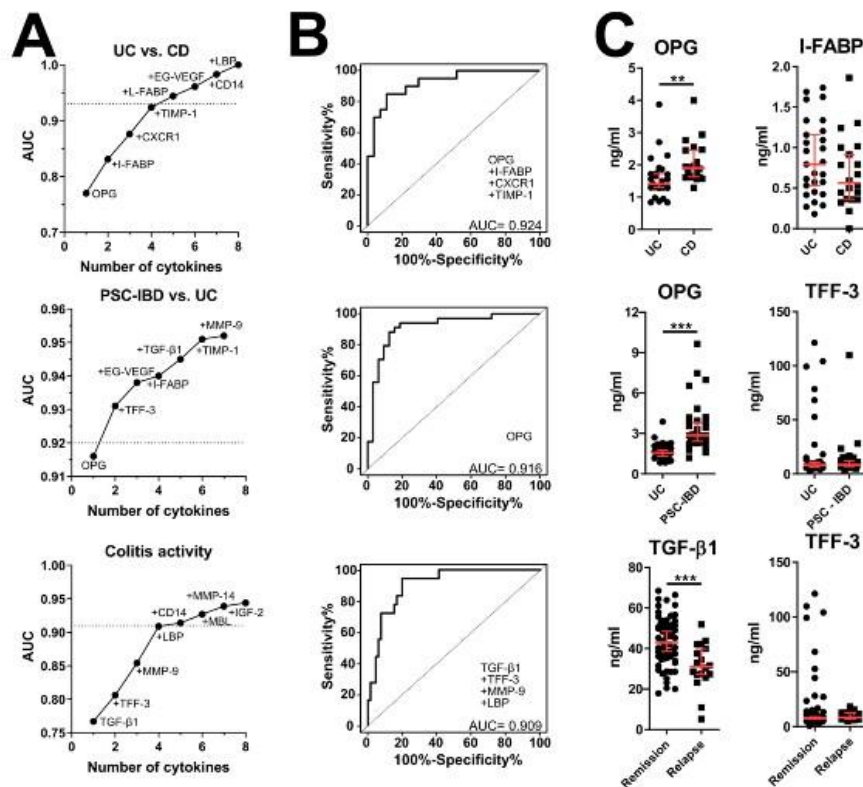


Figure 3. Significant differences in serum biomarkers between different types of IBD and activity. (A) Relative importance for each cytokine for the AUC increment within the best model found by regression analysis and (B) composite ROC curve analysis with the reliable discriminating power (AUC > 0.9). (C) Quantitative plot of the two most efficient discriminating factors analyzed by Mann–Whitney test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. HC ($n = 25$), UC patients ($n = 36$), CD patients ($n = 20$), PSC-IBD patients ($n = 32$), Remission ($n = 66$), Relapse ($n = 18$).

3.3. Serum Antibodies Against Bacteria

The importance of gut barrier functions and gut microbiota for the IBD pathogenesis suggested specific antibodies to gut commensal microbiota as suitable biomarkers. Therefore, we analyzed IgA, IgG and IgM antibodies specific to gut commensal bacteria in serum of IBD patients and healthy controls. We found that patients with IBD respond in similarly to most commensal bacteria as healthy controls, with few notable exceptions (Figure 4A). CD patients have generally lower antibody response, with significantly decreased IgA response to *Faecalibacterium* and *Bacteroides* as compared to healthy controls. In fact, 23% of patients with UC and 40% of patients with CD but none with the PSC-IBD have undetectable IgA response to *Faecalibacterium*. Further analysis showed clear positive correlation within isotypes, but not across them, suggesting that each of them acts independently and that gut commensals share antigenic determinants (Figure 4B). The latter case is supported by the fact that the strongest correlation is among least specific IgM and the weakest is among the generally more specific IgG.

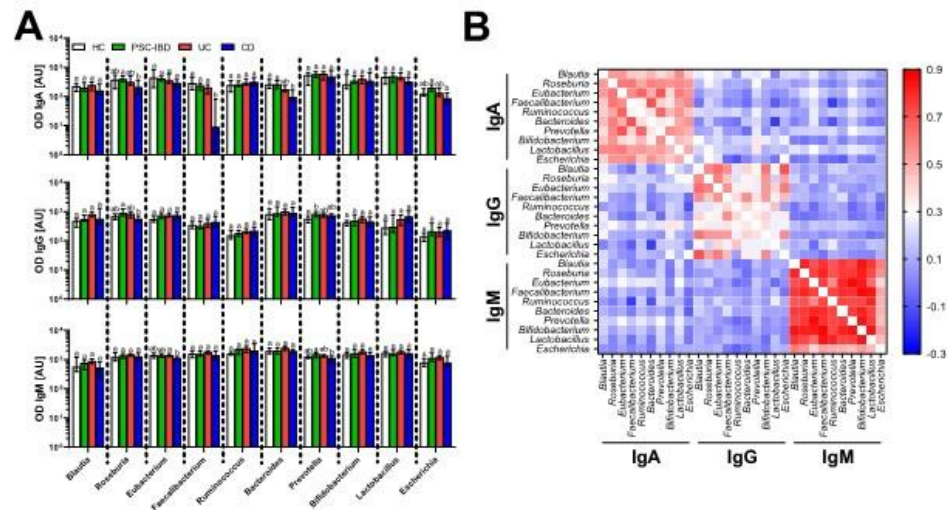


Figure 4. Differences in antibody response among patients with different forms of IBD and healthy controls. (A) Comparison of specific anti-bacterial antibody response. Different letters indicate statistically significant differences. (B) Correlation matrix showing Spearman's rank correlation coefficient. HC ($n = 27$), PSC-IBD ($n = 41$), UC ($n = 52$), CD ($n = 20$).

3.4. Circulating Gut Microbiota Reactive T-cells

While there is some specific pattern in CD154 expression on helper T cells among healthy controls and in different forms of IBD, PBMCs from all subjects reacted strongly to antigens from Clostridiales XIVa cluster, *Prevotella*, *Lactobacillus* and *Escherichia* in all subjects regardless of presence or absence of IBD. IBD patients have this spectrum of reactivity broadened to *Bifidobacteria* in patients with UC, *Faecalibacterium* in patients with PSC-IBD and CD and *Ruminococcus* in patients with CD (Figure S6). Circulating CD4⁺CD154⁺ T cells react to gut bacteria with production of several pro-inflammatory cytokines. However, their reactivity in patients with UC and PSC-IBD is generally similar to HC. T cells from CD patients react more strongly to antigens from *Roseburia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* and *Bacteroides* (Figure 5). The potential for maximum cytokine production, after super-antigen stimulation, is similar for all tested groups in all cytokines but IL-17. Upon stimulated with SEB, PBMCs from CD patients have higher significantly proportion of IL-17+CD154⁺ T cells than HC.

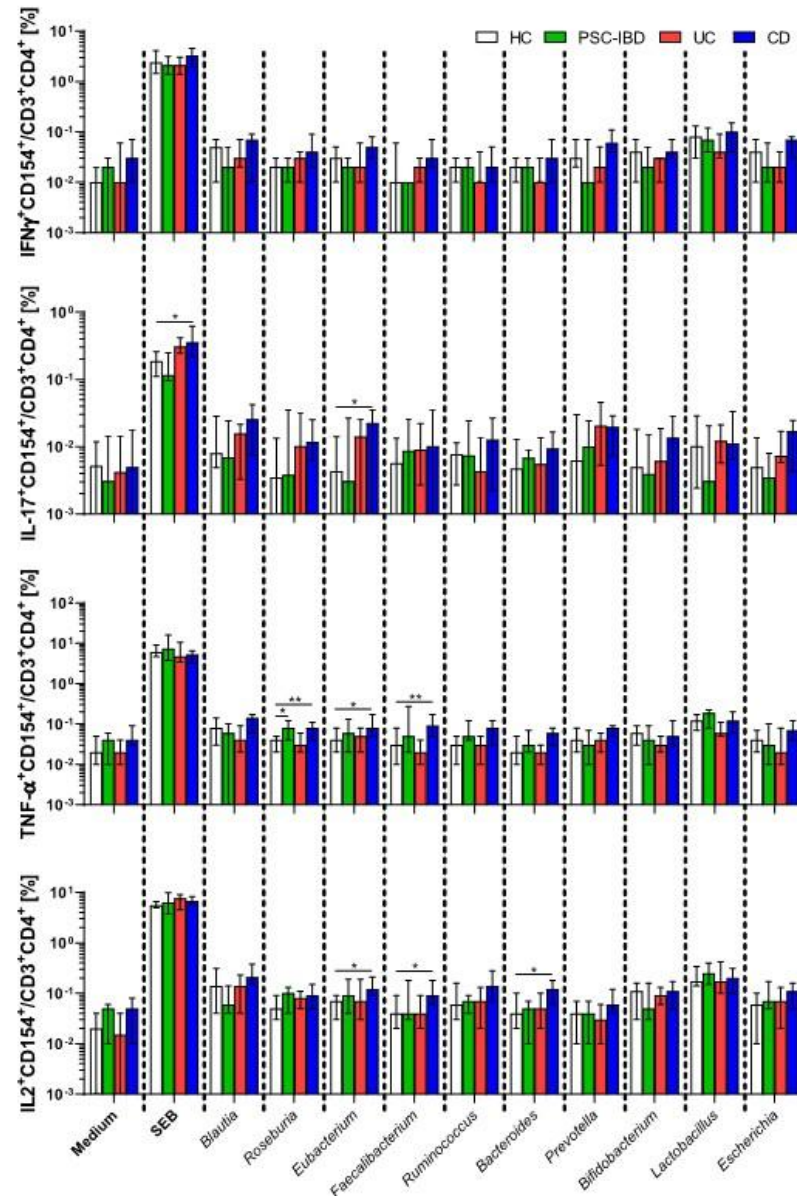


Figure 5. Circulating microbiota-reactive T cells react more strongly in CD patients than in any other form of IBD as analyzed by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test vs. HC group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. HC ($n = 19$), PSC-IBD ($n = 9$), UC ($n = 15$), CD ($n = 17$).

3.5. Effect of IBD Treatment

Next, we analyzed how the therapy influences the serum biomarkers (Figure S3), antibodies (Figure S4) and anti-microbial T cell response (Figure S5). We found that the effect of different treatments was generally milder than the effect of disease type, but there were several factors that

clearly distinguished the effect of drugs. Mesalazine (5-ASA) increased MMP-14 and decreased IgM against *Bacteroides*, Azathioprine decreased the proportion of IFN- γ production by CD154⁺CD4⁺ T cells after their stimulation with *Roseburia* and oral *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor) increased serum IgG against *Bifidobacteria*. Most changes were, however, induced by anti-TNF- α treatment, which significantly decreased serum OPG, increased IFN- γ production from *Roseburia*- or *Escherichia*-treated CD154⁺CD4⁺ T cells and increased TNF- α production from *Escherichia* treated CD154⁺CD4⁺ T cells.

4. Discussion

Common pathogenetic mechanisms, gut microbiota dysbiosis, gut barrier failure and immune system dysregulation, link the different types of IBD. Yet there are clear clinical differences between CD, UC and PSC-IBD. Here, we found several serum markers that not only distinguish the major forms of IBD, but also mirror its activity or treatment. Moreover, we compared anti-microbial antibody and T cell responses to gut commensal bacteria prevalent in the Czech population, finding clear shifts in CD patients.

Using protein array, we found that out of the 507 serum proteins, high EG-VEGF and CXCR1 are strongly associated with UC and low EG-VEGF and high OPG are typical for CD. This is an interesting distinction between the two major forms of IBD, suggesting that they may differ in angiogenesis and inflammation regulation. Members of the VEGF family are not only key positive mediators of angiogenesis, but they also have a pro-inflammatory role in inflammatory diseases, including IBD [44–46]. While mainly linked to reproduction, EG-VEGF (Prokineticin 1) may mediate similar biological effects. In fact, human monocytes activated with EG-VEGF have elevated IL-12 and TNF- α and down-regulated IL-10 production in response to Lipopolysaccharide (LPS) [47]. This effect may decrease the triggering threshold in monocytes in the intestinal wall, thus worsening the inflammation when the gut barrier is breached in the vicinity of ulcers in patients with UC. CXCR-1 is a G protein-coupled receptor, which can recruit the neutrophils in the site of inflammation, induce their oxidative burst and degranulation, thus worsening the local inflammation [48,49]. This supports our findings since the neutrophils are major constituents of inflammatory infiltrate in UC [50]. OPG is not only a key factor in bone density regulation [51] but it also affects cell turnover, differentiation, death and survival [52]. Previous studies found elevated serum OPG in patients with IBD and showed that OPG correlated significantly with concentration of pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF- α) suggesting that OPG production is influenced by cytokine milieu in chronic inflammation [53]. The increase in serum OPG in patients with IBD described by us and others [54] does not support the fact that IBD patients have generally worse bone mineral density than healthy controls [55]. While the negative effect of corticosteroid therapy on bone metabolism is well established [55], we did not find it mirrored in OPG levels in corticosteroid-treated patients. Nevertheless, we found a significant decrease in serum OPG in IBD patients on anti-TNF- α treatment. This may be caused by the feedback reaction of the organism to the anti-inflammatory treatment and efficient blockage of TNF- α . Moreover, this may explain the discrepancy in OPG with studies performed before the widespread use of TNF- α blockers. In our training cohort, we found OPG increased in CD, but not in UC patients. This may be due to the fact that protein array gives only relative quantification and that our UC cohort of patients for protein array consisted of only 6 patients, which may be too low. Therefore, we quantified this interesting factor with ELISA in the extended cohort of HC, UC and CD subjects. We found that the combination of OPG with six other proteins (EG-VEGF, CXCR-1, insulin-like growth factor 2 (IGF2), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), ROBO4 and TMEFF1) can reasonably well distinguish healthy individuals from those with IBD, so we selected the strongest predictors and performed the analysis on the extended experimental set. Interestingly, OPG was not only the strongest factor distinguishing CD and UC, on its own (AUC = 0.916) it could easily distinguish UC and PSC-IBD patients, where its levels are even higher than in CD, despite the fact that all PSC-IBD patients showed UC-like features of inflammation. This suggests that inflammatory control in PSC-IBD is very different from UC. This stronger response

was not limited to the OPG, because we found multiple serum biomarkers (e.g., MMP-14, MBL, CD14, I-FABP, L-FABP, ROBO4) increased in patients with PSC-IBD.

The extracellular matrix and connective tissue of the gut wall in healthy subjects is constantly remodeled and repaired by the carefully regulated release of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). The disturbance in the balance between synthesis and degradation of the extracellular matrix can result in typical features of IBD, such as ulcer formation, fibrosis or organ destruction [56]. In our dataset, decreased MMP-9 and increased MMP-14 were the strongest factors distinguishing IBD patients from healthy controls. Moreover, increased TIMP-1 was the second strongest factor distinguishing PSC patients without IBD from healthy controls and it was significantly increased in patients with PSC-IBD. However, the ability of TIMP-1 to distinguish between healthy and PSC patients may be influenced by the rarity of patients suffering from PSC without the concomitant IBD [3], so these results need to be verified on a larger cohort of patients. These findings clearly suggest the importance of the matrix metalloproteinase system in IBD pathogenesis. MMP-14 is a collagenase responsible for collagen degradation during re-modeling and for the activation of other enzymes and factors, thus triggering a proteolytic cascade or modulating important inflammatory factors [57]. The increase in MMP-14 we found in IBD patients may be a factor that mirrors the constant pathological remodeling of gut mucosa. MMP-9 is strongly expressed in inflamed mucosa during IBD [58] and several reports found increased serum MMP-9 as a marker for IBD activity in pediatric and adult IBD [59,60]. In our dataset, patients with IBD had significantly lower serum MMP-9 as compared to controls and there were neither significant differences in serum MMP-9 between patients with relapse and remission nor any correlation between MMP-9 and C-reactive protein (CRP). This discrepancy may be caused by the differences in the studied population, such as a high proportion of patients in remission and with the disease localized to the colon, since the disease localization may influence local and serum levels of MMPs [61]. Neither glucocorticoids nor TNF- α blockers influenced MMP-9 levels similarly as found in pediatric IBD patients by others [61].

Low serum TGF- β 1 was the strongest factor associated with the active disease (relapse) as compared to quiescent disease (remission) and together with other factors (TFF-3, MMP-9 and LBP) was capable of distinguishing between these two conditions with high accuracy (AUC = 0.909). TGF- β is important cytokine for the maintenance of intestinal homeostasis through its immunoregulatory functions, gut barrier support and wound healing [62–64]. However, by promoting collagen III production by myofibroblasts it is partially responsible for typical CD complications, such as intestinal fibrosis, fistulae and strictures [65]. While our findings of elevated anti-inflammatory TGF- β 1 in remission as compared to the active disease may be counterintuitive, one previous study already described similar findings in pediatric IBD [66]. This suggests that high TGF- β 1 in remission may reflect the organism's successful effort to dampen the inflammation during IBD, which makes TGF- β 1 an interesting potential candidate for relapse prediction.

Gut barrier failure and immune response to gut commensal microbiota are both hallmarks of IBD. The barrier failure leads to exposure of the immune cells in the gut mucosa to bacterial antigens, thus anti-bacterial immune response may serve as an indirect marker of chronic gut barrier failure. In order to measure which bacteria are targeted most in IBD as well as in HC, we selected 10 bacteria covering typical gut bacteria found in healthy Czech subjects [41]. We found that there are generally no differences between IBD patients and healthy controls except for patients suffering from CD that have generally lower antibody response against gut commensals. While the CD patients did not significantly differ from HC in IgM and IgG response, we found significantly decreased IgA response to *Faecalibacterium* and *Bacteroides* in CD patients compared with HC. In fact, 23% of UC patients and 40% of CD patients have undetectable IgA response to *Faecalibacterium*. In the normal healthy gut *F. prausnitzii* accounts for more than 5% of the total bacterial microbiota and is one of the most abundant commensal species [41,67], but it is markedly under-represented in the gut of patients with CD [68,69]. In fact, its low abundance on ileal mucosa or in feces predicts relapse in CD patients [69,70]. *F. prausnitzii* is able to produce not only anti-inflammatory molecules such as butyrate, but it can

modulate the host's immune response with a specific anti-inflammatory protein [71]. Our data suggest that the absence of *F. prausnitzii* during the inflammation in CD leads to a decrease in antibody response. We may speculate that significant decrease in IgA response to *Bacteroides* and non-significant decrease in *Blautia* and *Roseburia* may be caused by similar mechanisms, because many butyrate-producing bacteria, including *Blautia faecis*, *Roseburia inulinivorans* and *Bacteroides uniformis*, are significantly reduced in the gut of CD patients as compared to healthy controls [72]. There is, however, limitation to this assay, because many antigens are shared among species of a particular bacterial genus, while changes in abundances and/or biological activities may be specific to a particular species or even isolate [73].

T cell response to microbiota plays an important role in IBD pathogenesis and commensal gut bacteria provide antigenic stimulation that can activate pathogenic T cells and lead to chronic intestinal inflammation [74]. Specific polarization of these cells is linked to the particular type of IBD, with Th1 and Th17 T cells are associated with CD and Th2 T cells are often associated with UC [75,76]. However, gut microbiota-specific cells are normally property of the memory T helper repertoire of PBMCs and do not necessarily indicate interaction between immune cells and the gut commensal microbiota. Nevertheless, the cytokine profile of these cells is changed during the intestinal inflammation [43]. Therefore, we used multi-color flow cytometry to analyze how differences in their cytokine profiles reflect different forms and states of IBD. We found that T helper cells from healthy subjects quickly up-regulate CD154 when stimulated with antigens from *Blautia*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Lactobacillus* and *Escherichia* and that this spectrum of reactivity is generally broadened in patients with IBD. In our experiments, we focused on the response to bacteria found in the Czech population, so the reactivity to these particular microbes may not be universal worldwide.

When we focused on individual cytokines, we found only minor differences among the individual groups of IBD patients and HC, with a general increase in cytokine-producing memory T cells in CD group. Despite this trend, there were no significant differences in IFN- γ ⁺CD154⁺CD4⁺ T cells. Antigens from *Roseburia* had significant impact on memory T cells from PSC-IBD and CD as compared to HC and antigens from *Eubacterium*, *Faecalibacterium* and *Bacteroides* had significantly different impacts on memory T cells from PSC-IBD and CD as compared to HC. This suggests that while specific IgA response to *Roseburia*, *Faecalibacterium* and *Bacteroides* is decreased in patients with CD, their memory T cells react more strongly to these particular microbes. Unfortunately, in all bacteria lysate-stimulated samples the numbers of IL-4⁺CD154⁺CD4⁺ T cells were so low, that we were not able to perform reliable analysis, and had to exclude it from analyses. Interestingly, we found a significantly higher proportion of IL-17⁺CD154⁺ cells in CD patients and a similar trend in UC patients, but not in PSC-IBD group, when stimulated with the super-antigen SEB. We did not observe any other differences in super-antigen-stimulated samples. This suggests that, unlike circulating memory T cells from patients with CD (and to a lesser degree in patients with UC), those from patients with PSC-IBD do not have an increased capacity to form Th17 cells.

Decreasing the inflammatory response by steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs, biologicals and other immunomodulators is a cornerstone of IBD therapy and each type and severity of IBD requires an individual therapeutic approach. For example, anti-TNF- α is only rarely used in PSC-IBD patients and more severe cases of UC and CD are often treated with combination of drugs. This individual approach was present in our cohort as well, with 5-ASA used more in PSC-IBD patients than in UC patients and anti-TNF- α treatment is used only in UC and CD patients. The specificities of IBD pharmacotherapy limit the generalization of this study, but it does not make it irrelevant for clinical use, because the patients will be treated differently in the future. Therefore, we analyzed the effect of each therapeutic intervention in all patients with intestinal inflammation to find the therapy-specific biomarkers and to gauge the impact of the pharmacotherapy on the analyzed biomarkers. The effect was generally mild, with only a few notable exceptions. The significant increase in MMP-14 in patients treated with 5-ASA could be responsible for its general increase in IBD patients, because 82% of them were treated with 5-ASA. A similar effect could be partially responsible for the higher

levels of OPG in PSC-IBD as compared to UC, because anti-TNF- α was not used in any PSC-IBD patient. Moreover, we found an increase in IFN- γ production from *Roseburia*- or *Escherichia*-treated CD154⁺CD4⁺ T cells and increased TNF- α production from *Escherichia* treated CD154⁺CD4⁺ T cells in patients treated with anti-TNF- α . This may represent a biological background for rebound phenomenon when TNF- α blockers are excluded from the system and unchecked biological feedback increases the pro-inflammatory response. The opposite trend for Azathioprine, which acts directly on the cells, may reflect the biological background for the recently published meta-analysis finding the significant decrease in relapse rate when anti-TNF- α is discontinued under the screen of immune-modulators [77].

5. Conclusions

In this study we established the panels of biomarkers reflecting the specificities of pathogenesis of the different forms of IBD that may represent interesting future biomarkers. While the MMP system seems to be the strongest discriminator between healthy subjects and IBD patients, we identified markers reflecting colitis activity and anti-TNF- α treatment. Furthermore, we performed comprehensive screening of humoral and cellular adaptive immune response against gut commensal bacteria, finding several clear differences between healthy subjects and IBD patients, most notably CD. In general, these consisted of decreased IgA response to *Faecalibacterium* and *Bacteroides* with an increased T cell response to similar bacteria. These results stress the importance of gut barrier function and immune response to commensal bacteria in IBD pathogenesis and clearly show that PSC-IBD, UC and CD each represent a distinct form of IBD.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/719/s1>. Table S1: Bacteria and cultivation conditions. Figure S1: Significant differences in serum biomarkers between PSC-IBD, UC and CD patients and healthy controls as analyzed by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test. Different letters indicate statistically significant differences. Figure S2: Serum biomarkers do not describe the extent of colitis well. (A) Heat map and cluster analysis of the chosen proteins. (B) Composite ROC curve analysis for the biomarkers discriminating between partial and total colonic inflammation using the best model found by regression analysis. PSC-IBD ($n = 29$), UC ($n = 34$), CD ($n = 19$). Figure S3: Only a few serum biomarkers are influenced by IBD treatment, but their discriminating power is generally low. (A) Heat map and cluster analysis of the serum biomarkers. (B) Relative importance of each cytokine for the AUC increment within the best model found by regression analysis and quantitative plot of the strongest discriminating factor analyzed by the Mann–Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; other = anti- $\alpha 4\beta 7$ PSC-IBD ($n = 31$), UC ($n = 34$), CD ($n = 20$). Figure S4: Serum antimicrobial antibodies are influenced by IBD treatment only to a limited degree. (A) Heat map and cluster analysis of the serum biomarkers. (B) Relative importance of each anti-microbial antibody for the AUC increment within the best model found by regression analysis and quantitative plot of the strongest discriminating factor analyzed by Mann–Whitney test. * $p < 0.05$; other = anti- $\alpha 4\beta 7$; PSC-IBD ($n = 32$), UC ($n = 37$), CD ($n = 20$). Figure S5: Anti-TNF- α treatment influences cellular antimicrobial response in IBD patients. (A) Heat map and cluster analysis of the serum biomarkers. (B) Quantitative plot of the strongest discriminating factors selected by correlation analysis as analyzed by the Mann–Whitney test. *** $p < 0.001$. PSC-IBD ($n = 8$), UC ($n = 14$), CD ($n = 17$), AZA treated ($n = 13$), AZA non-treated ($n = 26$), anti-TNF- α treated ($n = 10$), anti-TNF- α non-treated ($n = 27$). Figure S6: Response of memory T helper cells has a specific profile for each healthy control ($n = 14$) and PSC-IBD ($n = 9$), UC ($n = 12$) and CD ($n = 13$) patient as analyzed by non-parametric paired Friedman test with Dunn’s multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Figure S7: Gating strategy for flow cytometry using SEB-stimulated PBMCs

Author Contributions: Conceptualization, H.T.-H. and M.K.; investigation, S.C., N.G., Z.G., D.S., Z.J.Z., K.K., Z.J., and Z.S.; resources, L.B. and P.D.; data curation, S.C., L.B., Z.G. and M.K.; methodology, S.C., Z.G., D.S., Z.J.Z., H.T.-H. and M.K.; formal analysis, S.C., N.G., Z.J.Z. and M.K.; writing—original draft preparation, S.C. and M.K.; writing—review and editing, S.C., N.G., L.B., D.S., Z.J.Z., Z.J., P.D., H.T.-H. and M.K.; funding acquisition, Z.J.Z., P.D. and M.K.

Funding: This research was funded by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant number 15-28064A, 17-31538A, 18-09-00493 and 18-05-00394, RayBiotech Biomarker Discovery Pilot Grant, grant number GRANT2010-KVE, and by Institute of Microbiology of the CAS, Institutional Research Concept RVO: 61388971.

Acknowledgments: We would like to thank Alena Kubatova for excellent technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ng, S.C.; Shi, H.Y.; Hamidi, N.; Underwood, F.E.; Tang, W.; Benchimol, E.I.; Panaccione, R.; Ghosh, S.; Wu, J.C.Y.; Chan, F.K.L.; et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies. *Lancet* **2018**, *390*, 2769–2778. [\[CrossRef\]](#)
2. Sartor, R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 577–594. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Loftus, E.V., Jr.; Harewood, G.C.; Loftus, C.G.; Tremaine, W.J.; Harmsen, W.S.; Zinsmeister, A.R.; Jewell, D.A.; Sandborn, W.J. PSC-IBD: A unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* **2005**, *54*, 91–96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Baumgart, D.C.; Sandborn, W.J. Inflammatory bowel disease: Clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **2007**, *369*, 1641–1657. [\[CrossRef\]](#)
5. Stein, R.B.; Hanauer, S.B. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf.* **2000**, *23*, 429–448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Swoger, J.M.; Binion, D.G. Supportive therapy in IBD: What additional diagnoses and conditions must be treated? *Dig. Dis.* **2010**, *28*, 452–462. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [\[CrossRef\]](#)
8. Hoffmann, C.; Dollive, S.; Grunberg, S.; Chen, J.; Li, H.; Wu, G.D.; Lewis, J.D.; Bushman, F.D. Archaea and fungi of the human gut microbiome: Correlations with diet and bacterial residents. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66019. [\[CrossRef\]](#)
9. Columpsi, P.; Sacchi, P.; Zuccaro, V.; Cima, S.; Sarda, C.; Mariani, M.; Gori, A.; Bruno, R. Beyond the gut bacterial microbiota: The gut virome. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 1467–1472. [\[CrossRef\]](#)
10. Tlaskalova-Hogenova, H.; Sterzl, J.; Stepankova, R.; Dlabac, V.; Vetical, V.; Rossmann, P.; Mandel, L.; Rejnek, J. Development of immunological capacity under germfree and conventional conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1983**, *409*, 96–113. [\[CrossRef\]](#)
11. Du, Z.; Hudcovic, T.; Mrazek, J.; Kozakova, H.; Srutkova, D.; Schwarzer, M.; Tlaskalova-Hogenova, H.; Kostovcik, M.; Kverka, M. Development of gut inflammation in mice colonized with mucosa-associated bacteria from patients with ulcerative colitis. *Gut Pathog.* **2015**, *7*, 32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Darfeuille-Michaud, A.; Neut, C.; Barnich, N.; Lederman, E.; Di Martino, P.; Desreumaux, P.; Gombiez, L.; Joly, B.; Cortot, A.; Colombel, J.F. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 1405–1413. [\[CrossRef\]](#)
13. Mirsepasi-Lauridsen, H.C.; Du, Z.; Struve, C.; Charbon, G.; Karczewski, J.; Krogfelt, K.A.; Petersen, A.M.; Wells, J.M. Secretion of Alpha-Hemolysin by *Escherichia coli* Disrupts Tight Junctions in Ulcerative Colitis Patients. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2016**, *7*, e149. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Tannock, G.W. Molecular analysis of the intestinal microflora in IBD. *Mucosal Immunol.* **2008**, *1*, S15–S18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Frank, D.N.; St Amand, A.L.; Feldman, R.A.; Boedeker, E.C.; Harpaz, N.; Pace, N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13780–13785. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Kverka, M.; Tlaskalova-Hogenova, H. Intestinal Microbiota: Facts and Fiction. *Dig. Dis.* **2017**, *35*, 139–147. [\[CrossRef\]](#)
17. McGuckin, M.A.; Eri, R.; Simms, L.A.; Florin, T.H.; Radford-Smith, G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 100–113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Tlaskalova-Hogenova, H.; Stepankova, R.; Kozakova, H.; Hudcovic, T.; Vannucci, L.; Tuckova, L.; Rossmann, P.; Hrcir, T.; Kverka, M.; Zakostelska, Z.; et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol. Immunol.* **2011**, *8*, 110–120. [\[CrossRef\]](#)
19. Chang, J.; Leong, R.W.; Wasinger, V.C.; Ip, M.; Yang, M.; Phan, T.G. Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 723–731 e721. [\[CrossRef\]](#)

20. Johansson, M.E.; Gustafsson, J.K.; Holmen-Larsson, J.; Jabbar, K.S.; Xia, L.; Xu, H.; Ghishan, F.K.; Carvalho, F.A.; Gewirtz, A.T.; Sjövall, H.; et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* **2014**, *63*, 281–291. [\[CrossRef\]](#)
21. Zeissig, S.; Burgel, N.; Gunzel, D.; Richter, J.; Mankertz, J.; Wahnschaffe, U.; Kroesen, A.J.; Zeitz, M.; Fromm, M.; Schulzke, J.D. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* **2007**, *56*, 61–72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Guthmann, F.; Borchers, T.; Wolfrum, C.; Wustrack, T.; Bartholomäus, S.; Spener, F. Plasma concentration of intestinal-and liver-FABP in neonates suffering from necrotizing enterocolitis and in healthy preterm neonates. *Mol. Cell Biochem.* **2002**, *239*, 227–234. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Coufal, S.; Kokesova, A.; Tlaskalova-Hogenova, H.; Snajdauf, J.; Rygl, M.; Kverka, M. Urinary Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Can Distinguish Necrotizing Enterocolitis from Sepsis in Early Stage of the Disease. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, 5727312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Kokesova, A.; Coufal, S.; Frybova, B.; Kverka, M.; Rygl, M. The intestinal fatty acid-binding protein as a marker for intestinal damage in gastroschisis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210797. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Faubion, W.A., Jr.; Fletcher, J.G.; O'Byrne, S.; Feagan, B.G.; de Villiers, W.J.; Salzberg, B.; Plevy, S.; Proctor, D.D.; Valentine, J.E.; Higgins, P.D.; et al. EMERging BiomARKers in Inflammatory Bowel Disease (EMBARK) study identifies fecal calprotectin, serum MMP9, and serum IL-22 as a novel combination of biomarkers for Crohn's disease activity: Role of cross-sectional imaging. *Am. J. Gastroenterol.* **2013**, *108*, 1891–1900. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Farkas, K.; Sarodi, Z.; Balint, A.; Foldesi, I.; Tislavicz, L.; Szucs, M.; Nyari, T.; Tajti, J.; Nagy, F.; Szepes, Z.; et al. The diagnostic value of a new fecal marker, matrix metalloproteinase-9, in different types of inflammatory bowel diseases. *J. Crohn's Colitis* **2015**, *9*, 231–237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Mathew, C.G. New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans. *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 9–14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. McGovern, D.P.; Gardet, A.; Torkvist, L.; Goyette, P.; Essers, J.; Taylor, K.D.; Neale, B.M.; Ong, R.T.; Lagace, C.; Li, C.; et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 332–337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Blumberg, R.S. Inflammation in the intestinal tract: Pathogenesis and treatment. *Dig. Dis.* **2009**, *27*, 455–464. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Adams, R.J.; Heazlewood, S.P.; Gilshenan, K.S.; O'Brien, M.; McGuckin, M.A.; Florin, T.H. IgG antibodies against common gut bacteria are more diagnostic for Crohn's disease than IgG against mannan or flagellin. *Am. J. Gastroenterol.* **2008**, *103*, 386–396. [\[CrossRef\]](#)
31. Ruemmele, F.M.; Targan, S.R.; Levy, G.; Dubinsky, M.; Braun, J.; Seidman, E.G. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 822–829. [\[CrossRef\]](#)
32. Zholudev, A.; Zurakowski, D.; Young, W.; Leichtner, A.; Bousvaros, A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: Diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am. J. Gastroenterol.* **2004**, *99*, 2235–2241. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Duarte-Silva, M.; Afonso, P.C.; de Souza, P.R.; Peghini, B.C.; Rodrigues-Junior, V.; de Barros Cardoso, C.R. Reappraisal of antibodies against *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) as persistent biomarkers in quiescent Crohn's disease. *Autoimmunity* **2019**, *52*, 37–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Sitaraman, S.V.; Klapproth, J.M.; Moore, D.A., 3rd; Landers, C.; Targan, S.; Williams, I.R.; Gewirtz, A.T. Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2005**, *288*, G403–G406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Iltaanen, S.; Tervo, L.; Halttunen, T.; Wei, B.; Braun, J.; Rantala, I.; Honkanen, T.; Kronenberg, M.; Cheroutre, H.; Turovskaya, O.; et al. Elevated serum anti-I2 and anti-OmpW antibody levels in children with IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, *12*, 389–394. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Papp, M.; Norman, G.L.; Altortay, I.; Lakatos, P.L. Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: Gadget or magic? *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 2028–2036. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Peyrin-Biroulet, L.; Standaert-Vitse, A.; Branche, J.; Chamaillard, M. IBD serological panels: Facts and perspectives. *Inflamm. Bowel Dis.* **2007**, *13*, 1561–1566. [\[CrossRef\]](#)
38. Lewis, J.D. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1817–1826.e1812. [\[CrossRef\]](#)

39. Cathelin, R.; Lopez, F.; Klopp, C. AGScan: A pluggable microarray image quantification software based on the ImageJ library. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 247–248. [\[CrossRef\]](#)
40. Tibshirani, R.; Hastie, T.; Narasimhan, B.; Chu, G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6567–6572. [\[CrossRef\]](#)
41. Bajer, L.; Kverka, M.; Kostovcik, M.; Macinga, P.; Dvorak, J.; Stehlikova, Z.; Brezina, J.; Wohl, P.; Spicak, J.; Drastich, P. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 4548–4558. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Kreher, C.R.; Dittrich, M.T.; Guerkov, R.; Boehm, B.O.; Tary-Lehmann, M. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J. Immunol. Methods* **2003**, *278*, 79–93. [\[CrossRef\]](#)
43. Hegazy, A.N.; West, N.R.; Stubbington, M.J.T.; Wendt, E.; Suijker, K.I.M.; Datsi, A.; This, S.; Danne, C.; Campion, S.; Duncan, S.H.; et al. Circulating and Tissue-Resident CD4(+) T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 1320–1337.e1316. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Basu, A.; Hoerning, A.; Datta, D.; Edelbauer, M.; Stack, M.P.; Calzadilla, K.; Pal, S.; Briscoe, D.M. Cutting Edge: Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Signaling in Human CD45RO+ CD4+ T Cells Promotes Akt and ERK Activation and Costimulates IFN- Production. *J. Immunol.* **2009**, *184*, 545–549. [\[CrossRef\]](#)
45. Danese, S. VEGF in inflammatory bowel disease: A master regulator of mucosal immune-driven angiogenesis. *Dig. Liver Dis.* **2008**, *40*, 680–683. [\[CrossRef\]](#)
46. Zdravkovic, N.D.; Jovanovic, I.P.; Radosavljevic, G.D.; Arsenijevic, A.N.; Zdravkovic, N.D.; Mitrovic, S.L.; Arsenijevic, N.N. Potential Dual Immunomodulatory Role of VEGF in Ulcerative Colitis and Colorectal Carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* **2014**, *11*, 936–947. [\[CrossRef\]](#)
47. Dorsch, M.; Qiu, Y.; Soler, D.; Frank, N.; Duong, T.; Goodearl, A.; O'Neil, S.; Lora, J.; Fraser, C.C. PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 426–434. [\[CrossRef\]](#)
48. Wu, L.; Ruffing, N.; Shi, X.; Newman, W.; Soler, D.; Mackay, C.R.; Qin, S. Discrete steps in binding and signaling of interleukin-8 with its receptor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31202–31209. [\[CrossRef\]](#)
49. Sabroe, I.; Jones, E.C.; Whyte, M.K.; Dower, S.K. Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* **2005**, *115*, 90–98. [\[CrossRef\]](#)
50. Muthas, D.; Reznichenko, A.; Balendran, C.A.; Bottcher, G.; Clausen, I.G.; Karman Mardh, C.; Ottosson, T.; Uddin, M.; MacDonald, T.T.; Danese, S.; et al. Neutrophils in ulcerative colitis: A review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Scand. J. Gastroenterol.* **2017**, *52*, 125–135. [\[CrossRef\]](#)
51. Simonet, W.S.; Lacey, D.L.; Dunstan, C.R.; Kelley, M.; Chang, M.S.; Luthy, R.; Nguyen, H.Q.; Wooden, S.; Bennett, L.; Boone, T.; et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **1997**, *89*, 309–319. [\[CrossRef\]](#)
52. Liu, W.; Xu, C.; Zhao, H.; Xia, P.; Song, R.; Gu, J.; Liu, X.; Bian, J.; Yuan, Y.; Liu, Z. Osteoprotegerin Induces Apoptosis of Osteoclasts and Osteoclast Precursor Cells via the Fas/Fas Ligand Pathway. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142519. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Franchimont, N.; Reenaers, C.; Lambert, C.; Belaiche, J.; Bours, V.; Malaise, M.; Delvenne, P.; Louis, E. Increased expression of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clin. Exp. Immunol.* **2004**, *138*, 491–498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Moschen, A.R.; Kaser, A.; Enrich, B.; Ludwiczek, O.; Gabriel, M.; Obrist, P.; Wolf, A.M.; Tilg, H. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut* **2005**, *54*, 479–487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Valentine, J.F.; Sninsky, C.A. Prevention and treatment of osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **1999**, *94*, 878–883. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Kapsoritakis, A.N.; Kapsoritaki, A.I.; Davidi, I.P.; Lotis, V.D.; Manolakis, A.C.; Mylonis, P.I.; Theodoridou, A.T.; Germentis, A.E.; Potamianos, S.P. Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)—1 and—4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* **2008**, *8*, 55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Somerville, R.P.; Oblander, S.A.; Apte, S.S. Matrix metalloproteinases: Old dogs with new tricks. *Genome Biol.* **2003**, *4*, 216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

58. Baugh, M.D.; Perry, M.J.; Hollander, A.P.; Davies, D.R.; Cross, S.S.; Lobo, A.J.; Taylor, C.J.; Evans, G.S. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1999**, *117*, 814–822. [\[CrossRef\]](#)
59. Lakatos, G.; Hritz, I.; Varga, M.Z.; Juhász, M.; Miheller, P.; Cierny, G.; Tulassay, Z.; Herszényi, L. The impact of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis.* **2012**, *30*, 289–295. [\[CrossRef\]](#)
60. Kofla-Dlubacz, A.; Matusiewicz, M.; Krzystek-Korpacka, M.; Iwanczak, B. Correlation of MMP-3 and MMP-9 with Crohn's Disease Activity in Children. *Dig. Dis. Sci.* **2011**, *57*, 706–712. [\[CrossRef\]](#)
61. Makitalo, L.; Rintamaki, H.; Tervahartia, T.; Sorsa, T.; Kolho, K.L. Serum MMPs 7-9 and their inhibitors during glucocorticoid and anti-TNF-alpha therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **2012**, *47*, 785–794. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Crowe, M.J.; Doetschman, T.; Greenhalgh, D.G. Delayed Wound Healing in Immunodeficient TGF- β 1 Knockout Mice. *J. Investig. Dermatol.* **2000**, *115*, 3–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Hahm, K.B. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* **2001**, *49*, 190–198. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Howe, K.L.; Reardon, C.; Wang, A.; Nazli, A.; McKay, D.M. Transforming Growth Factor- β Regulation of Epithelial Tight Junction Proteins Enhances Barrier Function and Blocks Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-Induced Increased Permeability. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 1587–1597. [\[CrossRef\]](#)
65. Stallmach, A.; Schuppan, D.; Riese, H.H.; Matthes, H.; Riecken, E.O. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **1992**, *102*, 1920–1929. [\[CrossRef\]](#)
66. Kader, H.A.; Tchernev, V.T.; Satyaraj, E.; Lejnine, S.; Kotler, G.; Kingsmore, S.F.; Patel, D.D. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am. J. Gastroenterol.* **2005**, *100*, 414–423. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Miquel, S.; Martin, R.; Rossi, O.; Bermudez-Humaran, L.G.; Chatel, J.M.; Sokol, H.; Thomas, M.; Wells, J.M.; Langella, P. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 255–261. [\[CrossRef\]](#)
68. Fujimoto, T.; Imaeda, H.; Takahashi, K.; Kasumi, E.; Bamba, S.; Fujiyama, Y.; Andoh, A. Decreased abundance of Faecalibacterium prausnitzii in the gut microbiota of Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *28*, 613–619. [\[CrossRef\]](#)
69. Rajca, S.; Grondin, V.; Louis, E.; Vernier-Massouille, G.; Grimaud, J.C.; Bouhnik, Y.; Laharie, D.; Dupas, J.-L.; Pillant, H.; Picon, L.; et al. Alterations in the Intestinal Microbiome (Dysbiosis) as a Predictor of Relapse After Infliximab Withdrawal in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 978–986. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Sokol, H.; Pigneur, B.; Watterlot, L.; Lakhdari, O.; Bermudez-Humaran, L.G.; Gratadoux, J.J.; Blugeon, S.; Bridonneau, C.; Furet, J.P.; Corthier, G.; et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 16731–16736. [\[CrossRef\]](#)
71. Quevrain, E.; Maubert, M.A.; Michon, C.; Chain, F.; Marquant, R.; Tailhades, J.; Miquel, S.; Carlier, L.; Bermudez-Humaran, L.G.; Pigneur, B.; et al. Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* **2016**, *65*, 415–425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Takahashi, K.; Nishida, A.; Fujimoto, T.; Fujii, M.; Shioya, M.; Imaeda, H.; Inatomi, O.; Bamba, S.; Sugimoto, M.; Andoh, A. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion* **2016**, *93*, 59–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Jensen, S.R.; Mirsepasi-Lauridsen, H.C.; Thysen, A.H.; Brynskov, J.; Krogfelt, K.A.; Petersen, A.M.; Pedersen, A.E.; Brix, S. Distinct inflammatory and cytopathic characteristics of Escherichia coli isolates from inflammatory bowel disease patients. *Int. J. Med. Microbiol.* **2015**, *305*, 925–936. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Iqbal, N.; Oliver, J.R.; Wagner, F.H.; Lazenby, A.S.; Elson, C.O.; Weaver, C.T. T helper 1 and T helper 2 cells are pathogenic in an antigen-specific model of colitis. *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 71–84. [\[CrossRef\]](#)
75. Feng, T.; Wang, L.; Schoeb, T.R.; Elson, C.O.; Cong, Y. Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 1321–1332. [\[CrossRef\]](#)

76. Calderon-Gomez, E.; Bassolas-Molina, H.; Mora-Buch, R.; Dotti, I.; Planell, N.; Esteller, M.; Gallego, M.; Marti, M.; Garcia-Martin, C.; Martinez-Torro, C.; et al. Commensal-specific CD4(+) cells from patients with Crohn's disease have a t-helper 17 inflammatory profile. *Gastroenterology* **2016**, *151*, 489–500. [[CrossRef](#)]
77. Casanova, M.J.; Chaparro, M.; Garcia-Sanchez, V.; Nantes, O.; Leo, E.; Rojas-Feria, M.; Jauregui-Amezaga, A.; Garcia-Lopez, S.; Huguet, J.M.; Arguelles-Arias, F.; et al. Evolution after anti-TNF discontinuation in patients with inflammatory bowel disease: A multicenter long-term follow-up study. *Am. J. Gastroenterol.* **2017**, *112*, 120–131. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PUBLIKACE 5

Transplantace jater pro primární sklerozující cholangitidu

Liver transplantation for primary sclerosing cholangitis

P. Drastich, L. Bajer, P. Wohl, D. Kamenář, J. Špičák, E. Honsová, P. Trunečka

Klinika hepatogastroenterologie, IKEM

Souhrn: Primární sklerozující cholangitida (PSC) je chronické cholestatické jaterní onemocnění s progresivním průběhem a neznámou etiopatogenezi. Průběh PSC je v těsném vztahu s výskytem idiopatického střevního zánětu (IBD), především pak s ulcerózní kolitidou (UC). Pacienti jsou zatíženi vysokým rizikem neoplastických změn, a to především v hepatobiliární oblasti a v kolon. V terminálním stadiu se PSC vyvíjí v cirhózu s výraznou portální hypertenzí. Dosud neexistuje efektivní medikamentózní léčba a podávání kyseliny ursodeoxycholové ve vysokých dávkách může být zatíženo vysokým výskytem nežádoucích účinků. Jaterní transplantace představuje v současnosti jediný kurativní přístup. Do retrospektivní analýzy jsme zařadili všechny nemocné s PSC, kteří podstoupili jaterní transplantaci (TXJ) během posledních 20 let v IKEM. **Výsledky:** Celkem se jednalo o 102 nemocných s mediánem věku při TXJ 37 let (14–68). IBD bylo potvrzeno u 64 nemocných (62,8 %) před TXJ. Kromě tří případů s Crohnovou chorobou se vždy jednalo o UC. Kumulativní přežívání bylo v 1, 5, 10 a 15 letech; 94,1 %, 93,0 %, 93,0 % a 82,3 %. Rekurence PSC (rPSC) byla potvrzena u 28 pacientů (33,7 %), u tří z nich vedla rPSC k retransplantaci. V šesti případech byl nalezen cholangiocelulární karcinom v jaterním explantátu, 50 % z těchto nemocných pak zemřelo na nádorovou progresi. Průběh ulcerózní kolitidy byl mírný nebo bylo onemocnění v remisi u 34/61 (55,7 %) nemocných sledovaných v IKEM po TXJ. U zbývajících 27 pacientů (44,3 %) probíhal střevní zánět aktivně. Čtyři nemocní podstoupili kolektomii v důsledku refrakterního průběhu kolitidy. De-novo ulcerózní kolitida byla zjištěna u 13 nemocných po TXJ, a to vždy s mírným průběhem. **Závěr:** Výsledky transplantační léčby nemocných s PSC jsou vynikající. V jaterním štěpu dochází často k rekurenci jaterního onemocnění, které si někdy vyžaduje i provedení retransplantace. Průběh UC po TXJ může být aktivní, a to i přes imunosupresivní léčbu. Pravidelná kolonoskopická vyšetření (interval 1–2 roky) jsou nezbytná k detekci častých kolorektálních neoplazií. Po TXJ může dojít i k výskytu de-novo IBD. Nález cholangiocelulárního karcinomu v jaterním štěpu (incidentalom) představuje závažný problém a negativně ovlivňuje přežití.

Klíčová slova: transplantace jater – primární sklerozující cholangitida – ulcerózní kolitida – cholangiocelulární karcinom – kolorektální karcinom

Summary: Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic, progressive cholestatic liver disease of unknown origin. PSC is closely associated with inflammatory bowel disease, mainly ulcerative colitis (UC). PSC presents a significantly increased risk of hepatobiliary and colorectal neoplastic changes. PSC gradually leads to cirrhosis with a significant portal hypertension. No effective medical therapy is available and treatment with a high dosage of ursodeoxycholic acid could even lead to a number of adverse effects. Liver transplantation (OLTx) is the only curative option currently available to improve survival. In this study, a retrospective analysis was performed for all patients who underwent OLTx for PSC over a 20-year period in the Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM), Prague. **Results:** A total of 102 patients underwent OLTx for PSC with a mean age of 37 years (14–68). Inflammatory bowel disease (IBD) was confirmed in 64 patients (62.8%) pre-LT. Except for three cases with Crohn's disease, all patients suffered from UC. Cumulated 1-, 5-, 10- and 15-year patient survival rates were 94.1%, 93.0%, 93.0% and 82.3% respectively. Recurrent PSC was determined in 28 patients (33.7%) with three who needed retransplantation. In six patients, cholangiocarcinoma was incidentally detected in explanted livers and three died due to advanced carcinoma. The course of ulcerative colitis (UC) was mild or in remission in 34/61 (55.7%) patients followed in our centre after OLTx without relevant clinical symptoms. The remaining 27 patients (44.3%) suffered from clinically active disease. Colectomy was performed in four patients due to refractory disease. On the other hand, UC newly developed in 13 patients after OLTx with a mild course of disease. **Conclusion:** The outcome for patients with PSC who have undergone transplantation is excellent. PSC frequently recurs in the hepatic allograft and retransplantation is often necessary. The course of UC after OLTx for PSC is frequently active despite immunosuppressive treatment. Detection of dysplastic changes and CRC confirm the usefulness of regular colonoscopic evaluations. New onset of UC can develop after OLTx. Incidentally found cholangiocarcinoma remains a difficult treatment problem with a low survival rate.

Key words: liver transplantation – primary sclerosing cholangitis – ulcerative colitis – cholangiocarcinoma – colorectal cancer

Primární sklerozující cholangitida (PSC) je chronické cholestatické jaterní onemocnění neznámé etiologie charakterizované zánětlivým poškozením intra- a/nebo extrahepatálního žlučového stromu s probíhající destrukcí, progresivní fibrózou a stenózami žlučovodů. Onemocnění bylo poprvé detailně popsáno Delbetem v roce 1924 a bylo považováno za raritní, do roku 1970 bylo kazuisticky popsáno pouze 100 případů. Rozvoj nových vyšetřovacích metod, jako jsou ERCP a později i MRCP, vedlo k poznání, že se jedná o mnohem častější chorobu. Multifokální striktury žlučového stromu způsobují laboratorní cholestázu a na zobrazovacích metodách charakteristický vzhled „růžence“.

Etiopatogeneze PSC není v současnosti známa i přes velký pokrok učiněný v poslední době. Důležitou roli hrají genetické vlivy a sourozenci nemocných s PSC nesou 9–39násobné riziko rozvoje tohoto onemocnění ve srovnání s obecnou populací, navíc jsou zatíženi i vyšším rizikem vzniku ulcerózní kolitidy (UC) [1]. Genetická vnímavost je spojena s určitými HLA znaky (např. B8, DR2, DR3, DR4, DRw52a). Na základě rozboru genomových asocičních studií (GWA) bylo prokázáno zapojení i non-HLA genů při vzniku nemoci (BCL2L11, MST1). Dalším faktorem uplatňujícím se v patogenezi jsou autoimunitní rysy onemocnění, až u 90 % nemocných nacházíme specifický typ pANCA. Důležitou roli hrají i složky přirozené imunity. Těsná asociace mezi PSC a UC vede k hypotéze, že střevní bakterie nebo jiné substance mohou migrovat ze zánětlivé střevní sliznice a způsobit chronický zánět a cholangitidu [2]. Mezi další hypotézy vyplývající z těsné asociace PSC s idiopatickými střevními záněty (IBD) patří představa, že za zánětlivé změny v oblasti žlučového stromu jsou zodpovědné paměťové buňky generované ve střevě. Tato hypotéza je podpořena expresí VAP 1 (vaskulární adhezní protein) a MADCAM-1 (mukozální adre-

zinová buněčná adhezní molekula-1) v oblasti střeva a jater. Některé studie se zaměřují i na složení žluče. Zajímavé je, že varianty ABCB4 genu (MDR3), které se uplatňují v patogenezi některých intrahepatálních cholestáz, ovlivňují i progresi PSC [3].

PSC může klinicky probíhat, ale zároveň i progredovat poměrně nenápadně nebo s typickými rekurentními epizodami cholangitidy provázenými bolestí v pravém podžebří, teplotou a ikterem. Typický průběh PSC je spojen s rozvojem jaterní cirhózy, která bývá provázena výraznou portální hypertenzí. Prevalence PSC je udávána v jedné studii ze Švédska 16,2/100 000 obyvatel (muži 23,7/100 000, ženy 8,9/100 000) se stoupajícím trendem v poslední době, v recentní studii z Nizozemska byla prevalence PSC menší, a to 6,0/100 000 obyvatel [4,5]. Z ČR nejsou známy přesné údaje, jen v IKEM je však v současnosti sledováno cca 200 nemocných před transplantací jater i po ní. Poměr výskytu PSC u mužů a žen je 2 : 1 a nejčastěji se diagnostikuje ve věku kolem 40 let. Medián přežití od stanovení diagnózy do transplantace jater, popřípadě úmrtí, je 13–21 let [5]. Pro PSC platí i geografické rozložení onemocnění, typicky se vyskytuje v severní Evropě, v Severní Americe a na Novém Zélandu, nejmenší frekvence onemocnění se pak pozoruje v Jižní Americe, v Asii a Africe. Geografický výskyt je podobný s rozložením IBD, se kterými je PSC tak těsně asociováno, až lze s jistotou nadsázkou uvést, že kolonoskopické vyšetření potvrzuje diagnózu PSC.

Diagnostika PSC je poměrně jednoduchá při provedeném ERCP nebo MRCP s biotickým potvrzením, které je však nezbytné jen v některých případech, mezi které patří tzv. „PSC malých žlučovodů“ s normálním obrazem žlučovodů, laboratorním obrazem cholestázy a typickým histologickým obrazem. Toto onemocnění zahrnuje pouze 5 % nemocných a bývá spojeno s pomalejší progresí onemocnění. Dalším

důvodem provedení jaterní biopsie je podezření na tzv. overlap (překryvný) syndrom, u kterého se vyskytují rysy autoimunity (autoimunitní hepatitida) při typickém vzhledu PSC na zobrazovacích metodách. Pokud je diagnostikován overlap syndrom, pak je léčebný přístup odlišný od pacientů s PSC používáním imunosupresiv v léčebném armamentáriu. Asi u 15 % nemocných lze nalézt změny na pankreatickém vývodu podobné těm u chronické pankreatitidy, ale zřídka jsou tyto změny spojeny s typickými symptomy chronické pankreatitidy. V diferenciální diagnostice PSC je třeba vyloučit sekundární sklerozující cholangitidu, parazitární poškození a ischemické léze, ale je nutno myslet i na portální biliopatii, nodulární regenerativní hyperplazii v důsledku medikamentózní léčby azatioprinem nebo 6-thioguaninem, sarkoidózu jater a cholangiopatii u AIDS. Léčba azatioprinem, často používaná u pacientů s PSC k léčbě aktivní UC, může být zatížena vysokým rizikem toxického vlivu na játra a pankreas. V nedávno publikované italské studii bylo toto riziko až desetinásobné ve srovnání s nemocnými s IBD bez PSC (41,7 % vs 4 %) [6]. Vzhledem k obtížnému posouzení jaterní toxicity u nemocných s PSC je vždy nutno léčbu azatioprinem v této skupině nemocných pečlivě zvážit. U 10–20 % pacientů s PSC nacházíme zvýšenou hladinu sérového imunoglobulinu G4, u těchto nemocných bývá průběh jaterního onemocnění agresivnější a vede k jaterní transplantaci za kratší dobu [7].

Z konkomitantního výskytu IBD se především jedná o UC, která se vyskytuje u 25–90 % PSC pacientů. Studie využívající i mikroskopické vyšetření sliznice kolon uvádějí prevalenci UC blížící se 90 %. Mírný a klidový průběh IBD může mít často i subklinickou podobu. Na druhé straně se PSC vyskytuje jen u cca 5–7 % UC pacientů, zvláště podezřelí jsou nemocní s vyššími hodnotami ALP. Asociace PSC

s Crohnovou nemocí (CD) je podstatně nižší (< 20 %) než s UC, diagnostické nepřesnosti nejsou dle našich zkušeností řídké a střevní onemocnění bývá často později překlasifikováno na UC. Idiopatický střevní zánět při PSC představuje specifický unikátní fenotyp označovaný jako PSC-IBD (PSC-UC či PSC-CD). Většinou nacházíme pankolitidu s klidným klinickým, ale i histologickým průběhem (proto vždy nutné biopsie), a pokud je přítomna aktivita, tak nejvýrazněji v pravostranném kolon, málokdy se pozoruje přítomnost zánětlivých polypů, někdy se popisuje vyšší frekvence tzv. back-wash ileitidy [8]. Pankolitida je pozorována u 94 % PSC-UC a kolitida u 96 % PSC-CD [9]. Jistou zvláštností pro UC při PSC bývá normální makroskopický vzhled rektu a i když tento specifický nálezní není podpořen všemi studiemi, je krátké vyšetření tlustého střeva (sigmoideoskopie) u těchto pacientů hrubou chybou. Nejenže se mohou přehlédnout výrazné zánětlivé změny v orálních částech, ale i kolorektální karcinom. Pacienti s PSC a UC jsou zatíženi 5–10násobným rizikem kolorektálního karcinomu (KRK) s typickým výskytem v pravostranném kolon a v mladším věku ve srovnání s pacienty s UC bez přítomnosti jaterní choroby [5]. Mezi další rizikové faktory KRK patří i dlouhodobě probíhající onemocnění střeva s extenzivním postižením, s přetrvávající aktivitou a familiární výskyt KRK. Nedysplastická střevní sliznice nemocných s UC a PSC je charakterizována vyšší expresí tumor supresorového genu p53 ve srovnání s nemocnými bez PSC, což může svědčit o vyšší náchylnosti k neoplastickým změnám [10]. Na základě současných vědomostí by mělo být provedeno kolonoskopické vyšetření u všech pacientů v intervalu 1–2 let. U pacientů, kteří museli podstoupit transplantaci jater, byl zaznamenán signifikantně mírnější průběh UC, menší frekvence kolektomií, nižší počet relapsů choroby a kratší

doba, po kterou bylo nevyhnutelné užívání kortikosteroidů [11]. Ve skupině, která transplantaci jater nepodstoupila, byl naproti tomu častěji proveden chirurgický zákrok a výskyt karcinomu tlustého střeva byl signifikantně vyšší. S jistou nadsázkou se dá uvést, že klinicky progresivní průběh primární sklerozující cholangitidy vyžadující transplantaci jater je spojen s mírnějším průběhem UC. Na druhé straně je nutno zmínit studii pocházející z Mayo kliniky, kde jedna třetina nemocných, která vyžadovala provedení kolektomie s ileoanální anastomózou, zemřela nebo vyžadovala provedení jaterní transplantace během 2,6 let sledování [12]. Samotná ileoanální anastomóza je pak u nemocných s PSC spojena s rizikem chronické pouchitidy a dysplastických změn. Podávání mesalazinu vykazuje preventivní vliv na rozvoj KRK i dysplastických změn kolon u pacientů s UC. U PSC-IBD nemocných nejsou výsledky studií jednoznačné, přesto nelze používání mesalazinu v této indikaci považovat za chybu.

Již zmíněný neoplastický potenciál PSC se týká nejen rizika kolorektálního karcinomu, ale především cholangiocelulárního karcinomu (CCK), který vede k úmrtí až u 15 % nemocných. Vznik onemocnění je náhlý, lze ho jen obtížně předvídat, průběh je agresivní, incidence a mortalita na tento typ karcinomu jsou v podstatě totožné. K podezření na rozvoj CCK vede zhoršení klinického stavu s rozvojem nových stenóz na žlučovodech spojené s nárůstem některých nádorových markerů, jako je CA 19-9 a v menší míře i CEA. Ve screeningu se využívá sonografie a MRCP spolu s MR vyšetřením břicha. K potvrzení diagnózy je pak vhodné ERCP vyšetření s rozбором tkáně dosažené brush-cytologií nebo biopsií doplněné i o FISH (fluorescenční in situ hybridizace) vyšetření. PSC je rovněž spojena s vyšším rizikem tumoru žlučníku (10–30krát vyšší ve srovnání s běž-

nou populací) a hepatocelulárního karcinomu [13].

Žádná léčba, která se v současnosti používá u nemocných s PSC, neprokázala dostatečnou efektivitu a transplantace jater (TXJ) zůstává jediným kurativním přístupem [14]. Podávání kyseliny ursodeoxycholové (UDCK) je spojeno spíše se zlepšením laboratorních hodnot než histologického obrazu. Na druhé straně je nutno uvést, že normalizace ALP, jehož zvýšení často na počátku vede k diagnostice PSC, je spojeno s lepší prognózou nemocných [15]. V nedávno publikované retrospektivní studii však došlo k normalizaci ALP nezávisle na léčbě UDCK. Naopak podávání vysokých dávek UDCK (25–30 mg/kg) je spojeno s vysokým rizikem závažných nežádoucích příhod, jako jsou vyšší výskyt jícnových a žaludečních varixů, úmrtí a nutnost provedení transplantace [16]. I když se tyto závažné nežádoucí účinky podle některých studií objevují pouze u nemocných v časnější fázi onemocnění a s normální hladinou bilirubinu [17], je v současnosti léčba vysokými dávkami UDCK kontraindikována. Kombinace dilatace dominantních žlučových stenóz a podávání UDCK má dubiozní efekt na dlouhodobou prognózu. Krátkodobé zlepšení prognózy při náhlém prohloubení obstrukčního ikteru nebo při recidivujících cholangitidách je však zřejmé. Rozporuplný je vliv UDCA na kolorektální karcinogenezi. Pardi et al v roce 2003 publikovali studii o pozitivním chemopreventivním působení UDCK, tento vliv však nebyl potvrzen v dalších studiích ani s použitím vyšších dávek UDCK [18,19], ale podle recentní metaanalýzy z Mayo kliniky lze UDCK v malých dávkách považovat za účinné chemopreventivní agens se signifikantním protektivním vlivem na rozvoj pokročilé kolorektální neoplazie (KRK nebo high-grade dysplazie) [20]. Řešení kostní nemoci při dlouhodobé cholestáze a symptomatická léčba pruritu jsou v klinické praxi samozřejmosti.

Tab. 1. Demografická data.

Tab. 1. Demographic data.

	PSC celkem		Muži		Ženy	
počet pacientů	102		76		26	
věk (medián)	37 (14–68)		45 (20–64)		34 (14–68)	
IBD	64	62,7 %	47	61,8 %	17	65,4 %
ulcerózní kolitida	61	59,8 %	45	59,2 %	16	61,5 %
Crohnova nemoc	3	2,9 %	2	2,6 %	1	3,8 %
stav po kolektomii	2	2,0 %	2	2,6 %	0	0,0 %
overlap AIH/PSC	13	12,7 %	8	10,5 %	5	19,2 %

Tab. 2. ACR a rekurence.

Tab. 2. Acute cellular rejection and recurrence.

Počet sledovaných po TXJ	Celkem		Muži		Ženy	
	83		60		23	
ACR	28	33,7 %	23	38,3 %	5	21,7 %
rekurence PSC	28	33,7 %	18	30,0 %	10	43,5 %
retransplantace	5	6,0 %	5	8,3 %	0	0,0 %

Výsledky

Základní údaje

V letech 1995–2013 podstoupilo transplantaci jater (TXJ) v IKEM Praha celkem 102 nemocných s diagnózou PSC (10,2 % ze všech transplantací). V této skupině převažovali muži v 74,5 % (76) a ženy představovaly 25,5 % (26) (tab. 1). Medián věku nemocných při TXJ byl 37 let (14–68). Idiopatický střevní zánět byl před transplantací prokázán u 64 nemocných (62,8 %), u 47 mužů a 17 žen. Většinou se jednalo o UC (61 případů), u tří nemocných byla prokázána CD. U 52 nemocných s UC (85,3 %) probíhala pankolitida, a to s mírným stupněm zánětu, nebo se jednalo o onemocnění v remisi, u devíti nemocných (14,8 %) byl střevní zánět hodnocen jako aktivní s maximálním vyjádřením aktivity v pravostranném kolon. V předtransplantačním období podstoupili dva pacienti resekční výkon na střevě. V prvním případě se jednalo o totální kolektomii pět let před transplantací pro adenokarcinom tlustého střeva. Druhý pacient podstoupil pravostran-

nou hemikolektomii s resekci terminálního ilea pro krvácení po polypektomii zánětlivých polypů dva roky před TXJ. Celkem u 13 pacientů (12,7 %) byl zjištěn overlap syndrom PSC a autoimunitní hepatitidy (AIH), v jednom případě se pak PSC sdružovala s deficitem α -1-antitrypsinu. U 79 transplantačních chirurgických výkonů (77,5 %) byla zvolena hepatojejunostomie a ve 23 případech (22,5 %) byla založena choledochocholedochostomie. V trvalém ambulantním sledování zůstává v IKEM 83 pacientů; deset z nich zemřelo a devět pacientů je sledováno ve Slovenské republice – o těch nemáme úplné informace.

Přežívání pacientů

Ze 102 pacientů jich přežívá 92. Roční, pětileté, desetileté a patnáctileté přežití je v našem souboru 94,1 %, 93,0 %, 93,0 %, resp. 82,3 % (graf 1). Nejčastější příčinou úmrtí byla generalizace cholangiocelulárního karcinomu (3) s průměrnou dobou přežití 12,7 (\pm 6,3) měsíců od transplantace. Jeden pacient s metastatickým rozsevem kar-

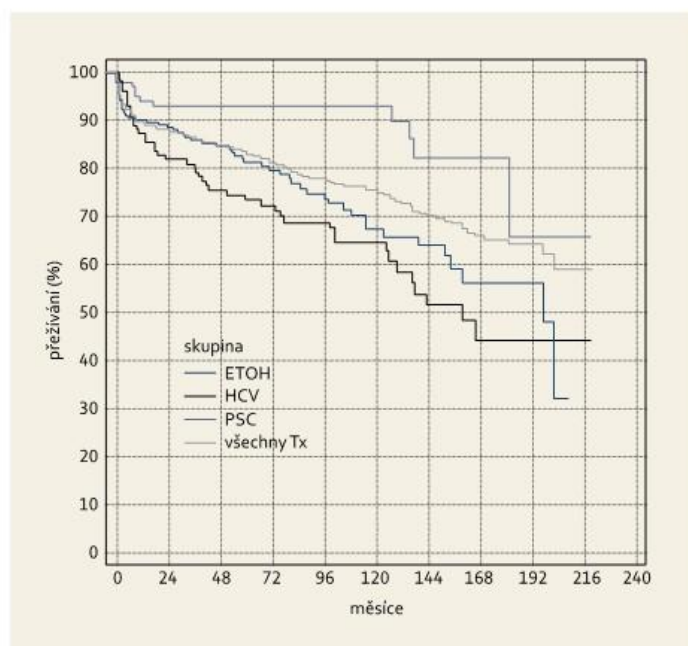
cinomu žlučníku zemřel na nádorovou kachexii 18 měsíců po TXJ. Mezi příčiny úmrtí dalších nemocných patří adenokarcinom tlustého střeva (1), karcinom ovarií (1), plicní embolie (1), ischemická CMP (1), posthemoragická nekróza štěpu (1) a selhání štěpu při protahovaných rejekcích (1).

Akutní celulární rejekce a rekurence PSC

Alespoň jedna epizoda akutní celulární rejekce (ACR) byla prokázána u 28 (33,7 %) sledovaných pacientů s dobrou reakcí na navýšení imunosupresivní léčby nebo pulz kortikoidů, v jednom případě však vedla protahovaná ACR k úmrtí. Rekurence základního onemocnění ve štěpu, alespoň stupně 1 dle Mayo kritérií, byla biopsicky verifikována u 28 (33,7 %) pacientů, u tří vedla k nutnosti retransplantace 5–10 let po TXJ (tab. 2). V době retransplantace měli dva nemocní mírnou aktivitu kolitidy (jeden omezenou pouze na rektum, druhý s pankolitidou) a u jednoho z nich nebyl nikdy prokázán střevní zánět. Ve skupině nemocných s overlap syndromem byla nalezena rekurence PSC u 3/13 (23,1 %) nemocných a rekurence AIH u 2/13 (15,4 %). Další dva pacienti podstoupili retransplantaci pro selhání jaterního štěpu při trombóze a. hepatica, resp. levé jaterní žíly.

Incidentalomy

Nález zhoubného novotvaru v jaterním explantátu byl v našem souboru popsán



Graf 1. Kumulativní přežívání (dle Kaplan-Meiera) pacientů po TXJ.

Graph 1. Cumulative survival (Kaplan-Meier) of patients after TXJ.

Tab. 3. Průběh IBD po TXJ.

Tab. 3. The course of IBD after TXJ.

	Celkem		Muži		Ženy	
IBD	61		42		19	
• UC	58	95,1 %	40	95,2 %	18	94,7 %
• CD	3	4,9 %	2	4,8 %	1	5,3 %
de-novo UC	13	21,3 %	8	19,0 %	5	26,3 %
Aktivita IBD:						
• remise	19	31,1 %	16	38,1 %	3	15,8 %
• mírná	15	24,6 %	8	19,0 %	7	36,8 %
• střední	19	31,1 %	12	28,6 %	7	36,8 %
• vysoká	8	13,1 %	6	14,3 %	2	10,5 %
kolektomie pro refrakterní průběh	4	6,5 %	3	7,1 %	1	5,3 %

u sedmi pacientů, v jednom případě se jednalo o karcinom žlučníku, u šesti zbylých pak o cholangiocelulární karcinom (CCK) u pěti mužů a jedné ženy. Tři z těchto pacientů přežívají 1–6,5 let po TXJ bez známek recidivy, u jednoho z nich pak byla v potransplantačním období provedena proktokolekto-

mie s ileostomií pro nález high-grade dysplazie sliznice kolon (graf 2).

Průběh idiopatického střevního zánětu

Z celkového souboru pacientů podstoupilo na našem pracovišti kolonoskopické vyšetření před transplan-

tací i po ní (více než 12 měsíců od TXJ) 69 nemocných (ostatní jsou anebo byli endoskopicky sledováni na jiném pracovišti, zemřeli anebo jsou po TXJ recentně). Z těchto nemocných se 61 (88,4 %) léčilo s IBD, a to 58 (84,1 %) pro ulcerózní kolitidu, u tří pacientů (4,4 %) pak bylo střevní zánětlivé onemocnění klasifikováno jako CD. Makroskopický obraz kolitidy byl zhodnocen dle endoskopického Mayo skóre (dle největší zaznamenané tíže) jako těžký u osmi pacientů (13,1 %), u 19 jako středně těžký (31,2 %), jako mírný u 15 (24,6 %), v 19 případech bylo popsáno stadium remise (31,2 %) (tab. 3). Low-grade dysplazie (LGD) byla nalezena u 4/61 (6,6 %) pacientů a high-grade dysplazie (HGD) byla detekována u 2/61 (3,3 %) nemocných (graf 3). De-novo IBD se vyskytlo u 13/61 pacientů (21,3 %), vždy se jednalo o mírné projevy ulcerózní kolitidy (tab. 3).

Kolorektální karcinom

Adenokarcinom tlustého střeva se po transplantaci vyskytl u tří mužů. Jeden z nich prodělal proktokolektomii s následnou zajišťovací chemoterapií 11 let po TXJ pro níže diferencovaný adenokarcinom kolon descendens, podobně jako 67letý nemocný, který podstoupil stejný výkon pro adenokarcinom lidenální flexury v roce 2011 s odstupem čtyř let po transplantaci. Jeden z našich pacientů, trvale sledovaný na Slovensku, však 11 let po TXJ na adenokarcinom tlustého střeva zemřel (graf 3).

Resekce kolon

Resekční výkon různého rozsahu na tlustém střevě po TXJ podstoupilo ještě dalších pět pacientů. Ve třech případech (dva muži a jedna žena) byla provedena totální kolektomie pro vysoce aktivní ulcerózní kolitidu, v jednom případě ileocekální resekce pro tubulovilózní adenom s high-grade dysplazií v terénu středně těžké kolitidy a jeden nemocný podstoupil subtotální kolektomii pro toxické megakolon s následnou proktokolektomií s dvouletým

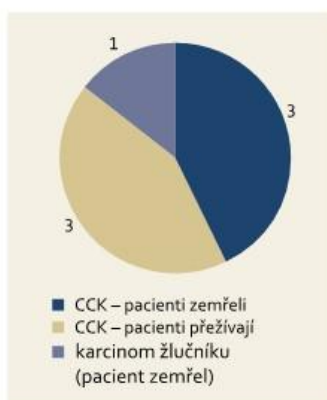
odstupem pro signifikantní postižení Crohnovou chorobou.

Diskuze

PSC představuje třetí nejčastější indikaci k transplantaci jater v IKEM, jedná se o 10,2 % všech transplantací a tento údaj je plně srovnatelný s daty získanými z ELTR (European Liver Transplant Registry) [21]. Důvodem k provedení transplantace je nejen terminální fáze jaterního onemocnění, ale i rekurentní cholangitida a klinické stavy svázané s cholestázou (zejména pruritus a kostní choroba). Navíc související vysoký neoplastický potenciál zařazuje PSC mezi velmi problematická onemocnění z hlediska správného načasování k transplantaci. Sledování pacientů s PSC v centru s možností jaterní transplantace je pak logickým přístupem v léčbě těchto nemocných.

Přežití štěpu jater i samotného příjemce se v posledních dvou desetiletích významně zlepšilo a dosahuje cca 80 % po pěti letech sledování [22]. V našem centru je přežití v 1, 5, 10 i 15 letech vyšší ve srovnání s ELTR. Nepochybně jsou výborné výsledky transplantační léčby v této skupině ovlivněny i faktem, že se jedná o mladší nemocné bez zásadních komorbidit (ve srovnání s nemocnými s etylickou jaterní cirhózou (ETOH) a HCV).

Na druhé straně je v posledních letech zřejmé, že PSC může v jaterním štěpu rekurovat (rPSC) až u pětiny nemocných, což může být spojeno se ztrátou jaterního štěpu a negativním vlivem na přežití nemocného [23]. Rekurence PSC představuje závažný medicínský problém s narůstající kohortou nemocných při málo známé epidemiologii, patogenezi i léčbě [3]. Riziko rekurence PSC je sníženo u nemocných s provedenou kolektomií před TX, což jen přispívá k představě o vzájemném imunologickém propojení mezi střevem a játry u PSC-IBD nemocných, a proto by kolektomie měla být vždy zvážena i u nemocných, u kterých je plánována retransplantace v důsledku

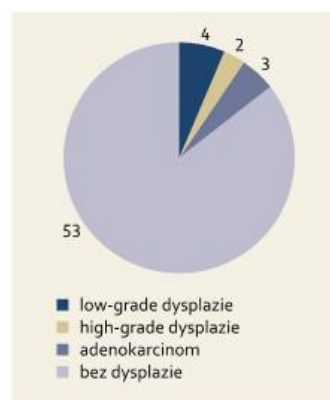


Graf 2. Incidentalomy – hepatobiliární neoplazie.

Graph 2. Incidentalomas – hepatobiliary neoplasia.

rPSC [24]. U našich nemocných jsme však neprokázali aktivní střevní onemocnění u těch s rPSC vyžadujících retransplantaci. Diagnostika rPSC je založena na radiologickém, biochemickém a histologickém vyšetření. Správná diagnóza rPSC je stále považována za problematickou vzhledem k obtížnosti odlišit rPSC od ostatních stavů vedoucích k podobnému nálezů na žlučovodech, jako jsou duktopennické rejekce, anastomotické striktury, stavy spojené s ischemií v povodí hepatické arterie a ABO inkompatibilita. Diagnostickou svízel představuje častá přítomnost ascendentní cholangitidy u nemocných s provedenou hepatojejunostomíí. Vyšší výskyt rPSC (33,7 %) v našem souboru může být způsoben i faktem, že jako hlavní kritérium rekurence jsme v naší retrospektivní analýze zvolili výsledek histologického vyšetření.

Paradoxně i přes imunosupresivní léčbu, která by hypoteticky měla vést k utlumení či kontrole aktivity střevního zánětu, může být klinický průběh UC po transplantaci jater velmi agresivní. Ve srovnání s předtransplantačním obdobím se to týká až 30–40 % nemocných [25,26], a to i přesto, že u PSC pacientů podstupujících TXJ bývá akti-



Graf 3. Kolorektální neoplazie u pacientů po TXJ pro PSC.

Graph 3. Colorectal neoplasia in patients after TXJ for PSC.

vita UC před TX nižší ve srovnání s PSC nemocnými bez nutnosti transplantace. Mezi spouštěče aktivity střevního onemocnění po TXJ lze nalézt CMV infekci, kouření, nerovnováhu subtypů T-lymfocytů v důsledku imunosupresivní léčby, rychlé vysazení kortikoidů a změny ve střevní mikrobiotě [26]. Imunosupresivní léčba po TXJ je v posledních 10 letech založena na podávání takrolimu, který však v porovnání s cyklosporinem A může vést ke zhoršení průběhu IBD [27]. Podávání azatioprinu prokazuje protektivní efekt na vzplanutí aktivity IBD po TX, jeho dávka (1–2 mg/kg) používaná u transplantovaných nemocných je však nižší ve srovnání s dávkou běžně používanou u IBD nemocných (2–2,5 mg/kg) [27]. Časné vysazení kortikoidů bývá u některých nemocných spojeno s relapsem zánětu, a proto podáváme malé dávky kortikoidů dlouhodobě, popřípadě je trvale v medikaci ponecháváme. V našem souboru při retrospektivní analýze nemůžeme vliv jednotlivých imunosupresivních režimů na aktivitu IBD dostatečně zodpovědně posoudit. Někdy může být za vzplanutím kolitidy nechtěné přerušení léčby mesalazinem po TX jater. V potransplantačním období se medikace zpravidla zcela

změní a na mesalazin se často zapo-
miná. V některých případech se k léčbě
aktivní UC používá i biologická léčba
anti-TNF α . Literární informace jsou jen
sporadické a vždy na malém počtu ne-
mocných. Použití infliximabu a ada-
limumabu může být užitečné, ale na
druhé straně je tuto volbu nutno peč-
livě zvážit vzhledem k vyššímu ri-
ziku infekčních příhod a potransplan-
tační lymfoproliferace [28]. V našem
souboru jsme zatím k léčbě inflixima-
bem nepřistoupili, většina nemocných
byla úspěšně léčena intenzifikací stan-
dardní medikamentózní léčby. Pokud
však byla aktivita UC u našich nemoc-
ných po TXJ spojena s refrakterním
průběhem (a většinou i s velkým vý-
skytem zánětlivých polypů), přistou-
pili jsme ke kolektomii ve čtyřech pří-
padech, z toho u jednoho nemocného
se jednalo o toxické megakolon při CD.
V literatuře se frekvence kolektomií
po TX pro refrakterní průběh nebo zá-
važné vzplanutí IBD pohybuje kolem
10 % [29]. Samotná ileoanální ana-
stomóza může být po TXJ provedena
bezpečně a v našem souboru jsme ne-
pozorovali žádné významné kompli-
kace. Vzácností není ani de-novo IBD,
která se vyskytuje u 14–30 % nemoc-
ných [29]. Vyšší incidence de novo
IBD je popisována u všech pacientů po
transplantaci solidních orgánů. Pato-
fyzilogický podklad tohoto paradox-
ního fenoménu není znám, podíl CMV
infekce ani změny ve střevní mikrobi-
otě nelze vyloučit. U pacientů s PSC
se však v některých případech nepo-
chybně jedná i o dříve nepoznanou UC.
V našem souboru se jednalo o de-novo
UC u 13 pacientů (21,3 %). Většinou
UC probíhá i po transplantaci klidně,
s minimální aktivitou, bez klinických
příznaků, jak potvrzujeme v našem
souboru.

Údaje o vyšším riziku kolonických
neoplastických změn po transplan-
taci jater jsou v literatuře rozporuplné,
v každém případě však platí výše uve-
dená rizika. Otázkou je, zda TXJ před-
stavuje další nezávislé riziko pro vznik

KRK. V našem souboru jsme našli čty-
řikrát low-grade dysplazii a dvakrát
high-grade dysplazii. Kolorektální
karcinom se objevil u tří nemocných
a v jednom případě byl dokonce i pří-
činou úmrtí. Alarmující výskyt kolorek-
tálních neoplazií plně ospravedlňuje
pravidelná kolonoskopická vyšetření
v 1–2ročním intervalu.

U nemocných s PSC po TXJ jater se
objevuje zvýšené riziko akutních celu-
lárních rejekcí (ACR) a pravděpodobně
až 50 % nemocných prodělá epizodu
ACR během prvních týdnů po TXJ [3].
Navíc může imunologická reakce při
ACR zvýšit riziko vzniku rPSC ve štěpu
přítomností většího podílu reaktivních
lymfocytů. Mechanizmy spojující ACR
a riziko rPSC však nejsou v současnosti
známy. Výskyt ACR byl v našem sou-
boru nižší (33,7 %), než jsou literární
údaje, jednou z možností vysvětlení je
i fakt, že všichni pacienti jsou v IKEM
po transplantaci léčeni i podáváním
UDKC, u které byl prokázán příznivý
efekt na výskyt ACR [30].

Trombóza a. hepatica patří mezi zá-
sadní časné komplikace transplantační
léčby, její frekvence je zvýšena u PSC-
IBD nemocných, zvláště těch s aktiv-
ním průběhem střevního zánětu [31].
V našem souboru však nepřesahoval
výskyt trombózy a. hepatica průměr
celého souboru transplantovaných
nemocných.

U 13 pacientů (12,7 %) byla TXJ pro-
vedena pro overlap syndrom, který
bývá spojen s vyšším rizikem rekurence
primární choroby, ale bez vlivu na pře-
žití [32], v IKEM jsme vyšší riziko reku-
rence PSC ani AIH neprokázali.

Výsledky transplantace jater u ne-
mocných s CCK, a to i incidentálním,
jsou mimořádně špatné a většina pa-
cientů umírá časné na recidivu karci-
nomu. Proto je tato indikace spojena
pouze s klinickými studiemi a v běž-
ném transplantačním programu před-
stavuje CCK dosud kontraindikaci.
V klinické praxi se však nevyhne in-
cidentalomům i přes pečlivý screening
CCK v předtransplantačním období.

V našem souboru se jednalo o šest
pacientů. Z toho tři zemřeli časně po
transplantaci a tři žijí bez známek re-
cidivy maligního onemocnění 1–6,5 let
po TXJ.

Závěr

Transplantace jater představuje jediné
kurativní řešení terminální fáze PSC.
Výsledky transplantační léčby jsou
v této skupině nemocných mimořádně
příznivé. Problémem je možnost reku-
rence základního onemocnění prová-
zené u některých nemocných i ztrátou
jaterního štěpu. Další výzvou je ře-
šení specifického idiopatického střev-
ního zánětu, který je se základním one-
mocněním těsně asociován a může
po transplantaci probíhat agresivně
a vznikat i de-novo. Nezbytná jsou pra-
videlná kolonoskopická vyšetření pro
nepochybné riziko vzniku kolonických
neoplazií. Nález incidentálního cholan-
giocelulárního karcinomu v jaterním
explantátu negativně ovlivňuje přežití
nemocných.

Literatura

1. Bergquist A, Montgomery SM, Bahmanyar S et al. Increased risk of primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis in first-degree relatives of patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6(8): 939–943.
2. Lee YM, Kaplan MM. Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1995; 332(14): 924–933.
3. Fosby B, Karlsen TH, Melum E. Recurrence and rejection in liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18(1): 1–15.
4. Lindkvist B, Benito de Valle M, Gullberg B et al. Incidence and prevalence of primary sclerosing cholangitis in a defined adult population in Sweden. *Hepatology* 2010; 52(2): 571–577.
5. Boonstra K, Weersma RK, van Erpecum KJ et al. Population-based epidemiology, malignancy risk and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2013. [Epub ahead of print].
6. Pallavicino F, Pellicano R, Reggiani S et al. Inflammatory bowel diseases and primary sclerosing cholangitis: hepatic and pancreatic side effects due to azathioprine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17(1): 84–87.

7. Mendes FD, Jorgensen R, Keach J et al. Elevated serum IgG4 concentration in patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(9): 2070–2075.
8. Drastich P, Kamenar D, Spicak J. Ulcerative colitis in patients with primary sclerosing cholangitis (PSC-UC) – a specific subgroup of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 130 (Suppl 2): A214.
9. Boonstra K, van Erpecum KJ, van Nieuwkerk KM et al. Primary sclerosing cholangitis is associated with distinct phenotype of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(12): 2270–2276.
10. Wohl P, Hucl T, Drastich P. Epithelial markers of colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2013; 19(14): 2234–2241.
11. Navaneethan U, Venkatesh PG, Mukewar S et al. Progressive primary sclerosing cholangitis requiring liver transplantation is associated with reduced need for colectomy in patients with ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10(5): 540–546.
12. Treepprasertsuk S, Björnsson E, Sinakos E et al. Outcome of patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis undergoing colectomy. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2013; 4(3): 61–68.
13. Razumilava N, Gores GJ, Lindor KD. Cancer surveillance in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2011; 54(5): 1842–1852.
14. Karlsen TH, Schrumpf E, Boberg KM. Update on primary sclerosing cholangitis. *Dig Liver Dis* 2010; 42(6): 390–400.
15. Stanich PP, Björnsson E, Gossard AA et al. Alkaline phosphatase normalization is associated with better prognosis in primary sclerosing cholangitis. *Dig Liver Dis* 2011; 43(4): 309–313.
16. Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VA et al. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2009; 50(3): 808–814.
17. Imam MH, Sinakos E, Gossard AA et al. High-dose ursodeoxycholic acid increases risk of adverse outcomes in patients with early stage primary sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34(10): 1185–1192.
18. Pardi DS, Loftus EV Jr, Kremers WK et al. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2003; 124(4): 889–893.
19. Lindström L, Boberg KM, Wikman O et al. High dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis does not prevent colorectal neoplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35(4): 451–457.
20. Singh S, Khanna S, Pardi DS et al. Effect of ursodeoxycholic acid use on the risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease: a systemic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19(8): 1631–1638.
21. Patkowski W, Skalski M, Zieniewicz K et al. Orthotopic liver transplantation for cholestatic diseases. *Hepatogastroenterology* 2010; 57(99–100): 605–610.
22. Adam R, Hoti E. Liver transplantation: the current situation. *Semin Liver Dis* 2009; 29(1): 3–18.
23. Alabraba E, Nightingale P, Gunson B et al. A re-evaluation of the risk factors for the recurrence of primary sclerosing cholangitis in liver allografts. *Liver Transpl* 2009; 15(3): 330–340.
24. Marelli L, Xirouchakis E, Kalambokis G et al. Does the severity of primary sclerosing cholangitis influence the clinical course of associated ulcerative colitis? *Gut* 2011; 60(9): 1224–1228.
25. Drastich P, Bajer L, Wohl P et al. Ulcerative colitis after orthotopic liver transplantation for primary sclerosing cholangitis: a single center experience. *Gastroenterology* 2013; 144 (Suppl 1): S628.
26. Papatheodoridis GV, Hamilton M, Mistry PK et al. Ulcerative colitis has an aggressive course after orthotopic liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1998; 43(5): 639–644.
27. Haagsma EB, Van den Berg AP, Kleibeuker JH et al. Inflammatory bowel disease after liver transplantation: the effect of different immunosuppressive regimens. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18(1): 33–44.
28. Mohabbat AB, Sandborn WJ, Loftus EV Jr et al. Anti-tumour necrosis factor treatment of inflammatory bowel disease in liver transplant recipients. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36(6): 569–574.
29. Singh S, Loftus EV Jr, Talwalkar JA. Inflammatory bowel disease after liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108(9): 1417–1425.
30. Clavien PA, Sharrara AI, Camargo CA Jr et al. Evidence that ursodeoxycholic acid prevents steroid-resistant rejection in adult liver transplantation. *Clin Transplant* 1996; 10(6 Pt 2): 658–662.
31. Joshi D, Bjarnason I, Belgumkar A et al. The impact of inflammatory bowel disease post-liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Liver Int* 2011; 33(1): 53–61.
32. Bhanji RA, Mason AL, Girgis S et al. Liver transplantation for overlap syndromes of autoimmune liver diseases. *Liver Int* 2013; 33(2): 210–219.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements” for biomedical papers.

Doručeno/Submitted: 21. 9. 2013

Přijato/Accepted: 6. 10. 2013

MUDr. Pavel Drastich
Klinika hepatogastroenterologie, IKEM
Videňská 1958/9, 140 01 Praha 4
padr@ikem.cz

PUBLIKACE 6

Retrospective Study

Risk of recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation is associated with *de novo* inflammatory bowel disease

Lukas Bajer, Antonij Slavcev, Peter Macinga, Eva Sticova, Jan Brezina, Matej Roder, Radim Janousek, Pavel Trunecka, Julius Spicak, Pavel Drastich

Lukas Bajer, Peter Macinga, Jan Brezina, Pavel Trunecka, Julius Spicak, Pavel Drastich, Department of Gastroenterology and Hepatology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Antonij Slavcev, Matej Roder, Department of Immunogenetics, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Eva Sticova, Department of Clinical and Transplant Pathology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Radim Janousek, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

ORCID number: Lukas Bajer (0000-0002-3815-3120); Antonij Slavcev (0000-0002-6154-9131); Peter Macinga (0000-0003-3699-6914); Eva Sticova (0000-0003-2486-6266); Jan Brezina (0000-0002-0440-9220); Matej Roder (0000-0002-3677-3473); Radim Janousek (0000-0003-2735-9403); Pavel Trunecka (0000-0002-4753-4419); Julius Spicak (0000-0002-3823-2881); Pavel Drastich (0000-0002-5656-9242).

Author contributions: All mentioned authors substantially contributed to presented research; Bajer L, Slavcev A, Sticova E and Drastich P wrote the paper; Slavcev A and Roder M performed HLA typing and analysed acquired data; Bajer L, Macinga P and Brezina J gathered and analysed retrospective data; Sticova E reviewed all relevant histological findings; Janousek R reviewed all relevant radiological findings; Trunecka P, Spicak J and Drastich P designed and supervised the research; Spicak J and Drastich P revised the manuscript

Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, No. 15-28064A and No. 16-27477A.

Institutional review board statement: This study was approved

by The Ethics Committee with multicenter competence of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital.

Informed consent statement: Patients were not required to give informed consent to the study because the analysis used anonymous clinical data that were obtained after each patient agreed to treatment by written consent.

Conflict-of-interest statement: All authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Data sharing statement: No additional data are available.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Corresponding author to: Lukas Bajer, MD, Department of Gastroenterology and Hepatology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, Prague 140 21, Czech Republic. lukas.bajer@ikem.cz
Telephone: +420-2-61362266
Fax: +420-2-61362615

Received: August 31, 2018
Peer-review started: September 2, 2018
First decision: October 8, 2018
Revised: October 20, 2018
Accepted: November 13, 2018
Article in press: November 13, 2018

Published online: November 21, 2018

Abstract

AIM

To evaluate risk factors for primary sclerosing cholangitis (PSC) recurrence (rPSC) after orthotopic liver transplantation (OLT) in patients with well-preserved colons.

METHODS

We retrospectively evaluated the medical records of all patients transplanted for PSC in our center between July 1994 and May 2015 and selected 47 with follow-up of at least 60 mo for further analysis based on strict inclusion and exclusion criteria. rPSC was confirmed by magnetic resonance or endoscopic retrograde cholangiopancreatography and liver biopsy. All patients were evaluated by protocolary pre-OLT colonoscopy with randomized mucosal biopsies. Colonoscopy was repeated annually after OLT. Both organ donors and recipients were human leukocyte antigen (HLA) typed by serological and/or DNA methods. All input data were thoroughly analyzed employing relevant statistical methods.

RESULTS

Altogether, 31 men and 16 women with a median (range) age of 36 (15-68) years at the time of OLT and a median follow-up of 122 (60-249) mo were included. rPSC was confirmed in 21/47 (44.7%) of patients, a median 63 (12-180) mo after transplantation. *De novo* colitis [rPSC in 11/12, $P \leq 0.05$, hazard ratio (HR): 4.02, 95% confidence interval (CI): 1.58-10.98] and history of acute cellular rejection (rPSC in 14/25, $P \leq 0.05$; HR: 2.66, 95%CI: 1.03-7.86) showed strong positive associations with rPSC. According to the univariate analysis, overlapping features of autoimmune hepatitis (rPSC in 5/5, $P \leq 0.05$) and *HLA-DRB1*07* in the donor (rPSC in 10/15, $P \leq 0.05$) represent other potential risk factors for rPSC, while the *HLA-DRB1*04* (rPSC in 0/6, $P \leq 0.05$), *HLA-DQB1*03* (rPSC in 1/11, $P \leq 0.05$), and *HLA-DQB1*07* (rPSC in 0/7, $P \leq 0.05$) recipient alleles may have protective roles.

CONCLUSION

De novo colitis and acute cellular rejection are clinical conditions significantly predisposed towards recurrence of PSC after liver transplantation.

Key words: Primary sclerosing cholangitis; Inflammatory bowel disease; Liver transplantation; Acute cellular rejection; Autoimmune hepatitis; Human leukocyte antigen; Immunosuppression

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: This study demonstrates that patients with *de novo* colitis after liver transplantation for primary

sclerosing cholangitis (PSC) are significantly predisposed towards primary liver disease recurrence (rPSC). History of acute cellular rejection of the liver graft, overlapping features of autoimmune hepatitis (autoimmune hepatitis /PSC) and certain human leukocyte antigen (HLA)-DQ and HLA-DR alleles in both donors and recipients may also have an impact on rPSC development. These data based on analysis of well-defined cohort with long median follow-up suggest that thorough routine endoscopic, radiological and immunological examination (both pre- and post-transplant) is crucial for identifying high-risk patients.

Bajer L, Slavcev A, Macinga P, Sticova E, Brezina J, Roder M, Janousek R, Trunecka P, Spicak J, Drastich P. Risk of recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation is associated with *de novo* inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2018; 24(43): 4939-4949 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v24/i43/4939.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4939>

INTRODUCTION

Primary sclerosing cholangitis (PSC), a chronic liver disorder of unknown etiology, is characterized by inflammation, fibrosis, and stenosis of both extra- and/or intrahepatic bile ducts^[1,2]. The disease may progress to cirrhosis and eventually to liver failure and death^[3]. For those who develop end-stage liver disease, orthotopic liver transplantation (OLT) remains the only effective treatment available^[4].

PSC is accompanied by concomitant inflammatory bowel disease (IBD) in up to 80% of patients^[5]. IBD in patients with PSC has been proposed to be a phenotype distinct from ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) and is often referred to as "PSC-IBD"^[6,7]. PSC-IBD is usually characterized by a mild course, but often deteriorates after OLT despite long-term immunosuppressive treatment^[8].

When compared with other indications for OLT, PSC has satisfactory post-transplantation graft and patient survival, reaching nearly 80% at 5 years after OLT^[9-11]. However, a recurrent form of PSC (rPSC) appears in a significant proportion of patients after OLT^[12] and may eventually lead to graft loss and liver retransplantation (re-OLT)^[13]. The pathogenesis of rPSC is most likely multifactorial, combining both pre- and post-OLT factors with genetic predisposition, and is probably linked with that of the primary disease^[14].

rPSC was first described as a unique clinical entity by Lerut *et al*^[15] in 1988. As several other clinical conditions may lead to biliary stricturing post-OLT, thus mimicking rPSC, Graziadei *et al*^[16] proposed a series of diagnostic criteria in 1999.

Risk factors for rPSC have been described previously^[14], and include recipient sex^[12,17], recipient-

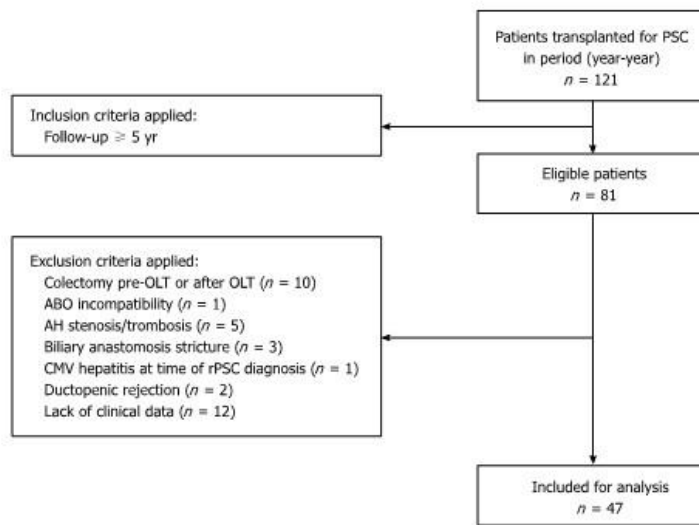


Figure 1 Study design, exclusion criteria, and the study cohort. OLT: orthotopic liver transplantation; CMV: Cytomegalovirus.

donor sex mismatch^[18], donor^[17] and recipient^[19] age, recipient cytomegalovirus (CMV) infection^[20], a related living-donor graft^[20,21], single and/or multiple episodes of acute cellular rejection (ACR)^[17,19,22], corticoreistant ACR^[22,23], use of muromonab-CD3 (OKT3)^[24], history of cholangiocarcinoma pre-OLT^[25], presence of the *human leukocyte antigen (HLA)-DRB1*08* gene (particularly in the absence of *DQB1*04*) in either donor or recipient^[22], absence of the HLA-DR52 antigen in the donor^[19], UC treatment with corticosteroid continuing for more than 3 mo after OLT^[26], and level of liver dysfunction at time of OLT^[17,27]. However, the strength of this evidence is not clear, as the previous findings, made mainly from retrospective studies, are inconsistent or even contradictory.

Although the conclusions of previous investigations into the role of IBD in rPSC are inconsistent, a link between the two clinical entities seems probable primarily because of a significant reduction of rPSC in patients without IBD (or with colectomy pre-OLT)^[12,26,28,29]. The presence^[26,27] or activity of IBD before or after OLT may influence graft survival^[17,30,31]. However, not all studies have found a relationship between IBD and rPSC^[22,32]. The aim of this study was to assess the risk of rPSC after OLT in a carefully selected cohort of patients with well-preserved colons (no history of colorectal surgery).

MATERIALS AND METHODS

In this retrospective study, we analyzed the records of all patients who had received OLT for PSC at the Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, between July 1994 and May 2015. The most common indication for OLT was recurrent episodes of acute cholangitis and/or liver dysfunction. An electronic database and

printed medical records were both evaluated. PSC was diagnosed by pre-OLT cholangiographic examination, then confirmed, and in two cases established, after histological evaluation of liver explants. The stage of liver disease at the time of OLT was determined by the unrevised MELD score (used prior to January 2016). The following data were evaluated in all patients: Sex, age at time of OLT, MELD score, graft configuration, type of anastomosis, cold ischemia time, donor age, presence of donor liver steatosis, donor and recipient ABO type, donor and recipient CMV status, primary immunosuppressive protocol after OLT, signs of overlap with autoimmune hepatitis (PSC/AIH), presence of cholangiocarcinoma, donor and recipient *HLA-DRB1** and *-DQB1** types, IBD status, history of pre- or post-OLT colectomy and interim follow-up records after OLT (presence/treatment regimen of ACR, type of primary immunosuppression, dose and duration of corticosteroid administration).

Study design, eligibility criteria

Of 121 patients transplanted for PSC, 47 were included and evaluated (Figure 1). In accordance with the Mayo Clinic Criteria for Diagnosis of rPSC^[16], the primary exclusion criteria were presence of hepatic artery thrombosis and/or stenosis, ABO incompatibility, ductopenic rejection, and presence of biliary strictures within 3 mo after OLT. We excluded one patient with active CMV hepatitis at the time of rPSC diagnosis, patients with a history of anastomotic stricture(s), and patients who had had colon surgery before or within 60 mo after OLT. Twelve patients had insufficient post-OLT data, as their follow-up had been managed at another center. Only patients with complete medical records including annual colonoscopy, regular blood tests, and liver biopsies following the standard protocol were eligible.

Table 1 Demographic characteristics, transplant population, and study cohort *n* (%)

	Patients transplanted for PSC (<i>n</i> = 121)	Study cohort (<i>n</i> = 47)
Sex, recipients; male/female	88/33 (72.7/27.3)	31/16 (66/34)
Median age, recipient, yr (range)	36 (12-64)	36 (12-60)
Median age, donor, yr (range)	34 (2-66)	37 (10-61)
Median follow-up, mos (range)	87 (0-249)	116 (60-249)
MELD score at time of OLT, median (range)	15 (6-34)	15 (8-32)
Overlap syndrome AIH/PSC pre-OLT	20 (16.5)	5 (10.6)
Graft configuration: whole/reduced	116/5 (95.9/4.1)	47/0 (100/0)
Cholangiocarcinoma in liver explant	8 (6.6)	0 (0)
Cold ischemia median time, min (range)	300 (125-637)	319 (175-637)
Type of anastomosis: End-to-end/Roux-en-Y	31/90 (25.6/74.4)	7/40 (14.9/85.1)
Tacrolimus-based primary immunosuppressive regimen	92 (76.0)	32 (68.1)
Cyclosporine-based primary immunosuppressive regimen	29 (24.0)	15 (31.9)
IBD pre-OLT	76 (62.8)	29 (61.7)
UC	75 (98.7)	29 (100)
CD	1 (1.3)	0 (0)
Indeterminate colitis	0 (0)	0 (0)
Mild course of IBD pre-OLT	62 (81.6)	29 (100)
Active course of IBD pre-OLT	14 (18.4)	0 (0)
Colectomy pre-OLT	4 (3.3)	-
Liver retransplantation, total	15 (12.4)	7 (14.9)
Liver retransplantation, for rPSC	8 (6.6)	6 (12.8)

PSC: Primary sclerosing cholangitis; OLT: Orthotopic liver transplantation; AIH: Autoimmune hepatitis; IBD: Inflammatory bowel disease; UC: Ulcerative colitis; CD: Crohn's disease; rPSC: Recurrent PSC.

Establishing a diagnosis of rPSC

The diagnosis of rPSC was based on Mayo Clinic criteria, as proposed by Graziadei *et al.*^[16]. These include (1) confirmed diagnosis of PSC before OLT; (2) intra- and/or extrahepatic biliary strictures, beading, and irregularities occurring on cholangiograms > 90 d after OLT; and (3) fibrous cholangitis and/or fibro-obliterative lesions with or without ductopenia, and biliary fibrosis or cirrhosis on liver biopsy. Liver graft biopsies were acquired according to protocol after 1, 2, 3, 5, 7, 10, and 15 years (or as clinically indicated) post-OLT. Liver biopsy specimens were evaluated independently by two experienced pathologists and assessed according to the histological scoring system proposed by Graziadei *et al.*^[16]. After re-OLT, rPSC was histologically confirmed in explanted liver grafts. Patients with a Mayo Clinic score of at least 1 (marginal) for rPSC in liver biopsy and those with clinical suspicion (e.g., elevated liver enzymes) were examined cholangiographically to confirm/refute the diagnosis. All cholangiograms were reviewed by an experienced radiologist (RJ) who was blinded to the clinical and histological diagnoses.

Endoscopic surveillance

All patients were evaluated by pancolonoscopy with randomized mucosal biopsies following the pre-OLT examination protocol. In patients included in the study cohort, colonoscopy was performed annually after OLT. IBD severity was assessed by the Mayo Scoring system^[33].

Human leucocyte antigen (HLA) typing

Patients and their organ donors were HLA typed by serological and/or DNA methods. Serological typing of

HLA class I antigens was performed by complement-dependent cytotoxicity assay using local or commercial HLA typing trays, following standard procedures (BAG Health Care GmbH, Lich, Germany). DNA typing of HLA class I and class II antigens was performed using PCR-SSP or PCR-SSOP typing trays (Olerup SSP, Stockholm, Sweden; One Lambda Inc, Canoga Park, United States).

Statistical analysis

All data were recorded and sorted using Microsoft Excel and analyzed using JMP® software (version 10.0.0). Kaplan-Meier analysis was used to estimate graft and patient survival. Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test (depending on the nature of the data) was used for comparison of continuous variables, which were reported as median (range). Discrete variables were compared using Fisher's exact test (two-tailed) and expressed as number (*n*) and percentage (%). Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazards regression model. A *P*-value ≤ 0.05 was considered as statistically significant. The recurrence (endpoint) time distribution following OLT was estimated by the Kaplan-Meier method, and the respective groups were compared using the log-rank test.

RESULTS

Of the 1139 first liver transplants performed between July 1994 and May 2015, 121 (10.6%) were transplanted for PSC or PSC/AIH (Table 1). All patients received either a whole (*n* = 116) or reduced (*n* = 5) liver graft. No patient received a split graft or a graft from a living donor.

Cholangiocarcinoma was detected in eight liver explants. No other type of malignant tumor, including

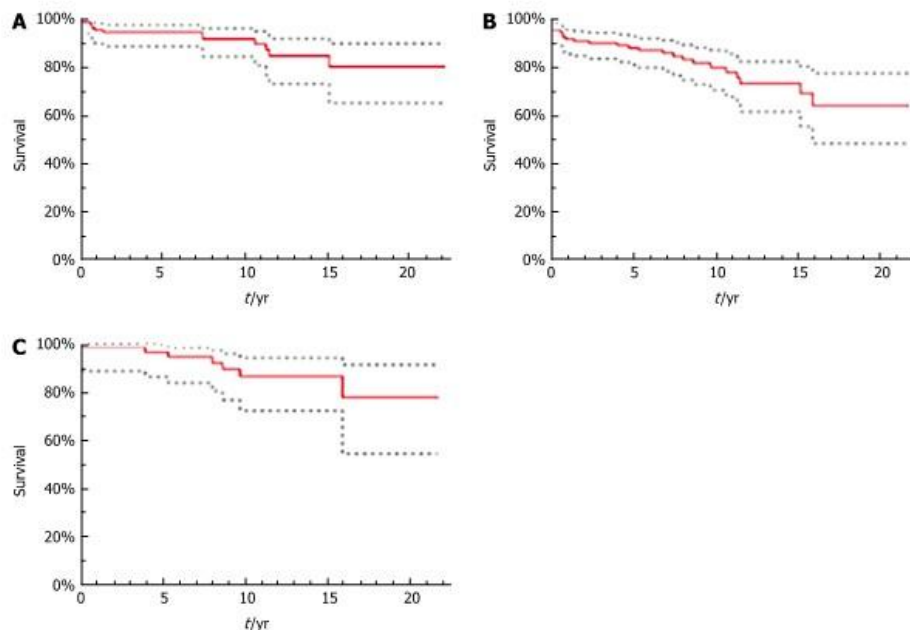


Figure 2 Kaplan-Meier plots of patient (A) and graft (B) survival in the total population, and graft survival in the study cohort (C).

hepatocellular carcinoma, was found. The primary immunosuppressive protocol was based solely on calcineurin inhibitors. Cyclosporine was routinely used as the primary immunosuppressant until November 2004, when the protocol was universally changed to use tacrolimus. All recipients underwent colonoscopy within 12 mo before OLT. Three patients with UC underwent colectomy, one each for adenocarcinoma, a refractory course of colitis, and toxic megacolon. One patient with CD had a colectomy because of severe bleeding after complicated multiple polypectomy.

Survival outcome

In the total patient population, 1-, 5-, 10-, and 15-year survival was 95.0%, 94.2%, 91.4%, and 84.6%, respectively (Figure 2A). Overall survival in the final study cohort is not shown because no patient died during follow-up. Graft survival in the total population was 91.0% at 1 year, 87.6% at 5, 79.5% at 10, and 72.8% at 15 years (Figure 2B). Of the 15 patients in the total population with re-OLT, eight (53.3%) were indicated because of rPSC. Other indications for re-OLT were primary graft dysfunction, hepatic artery thrombosis and post-hemorrhagic shock. Graft survival in the study cohort was 98.2% at 1 year, 96.2% at 5, 86.2% at 10, and 86.2% at 15 years (Figure 2C). Six of seven patients (85.7%) in the study cohort experienced re-OLT for rPSC, and one (13.3%) had re-OLT for graft failure caused by hepatic artery thrombosis.

Univariate analysis of risk factors for rPSC

Of the 47 recipients included in the study cohort, 31

were men and 16 were women; their median age was 36 (12-60) years at the time of OLT, and median follow-up was 122 (60-249) mo. rPSC was diagnosed in 21 patients (44.7%) during a median of 63 (12-212) mo of follow-up after OLT. Twelve of these patients were men and nine were women, with a median age of 35 (12-68) years at time of OLT (Table 2).

In total, 29 patients (61.7%) were diagnosed with IBD prior to OLT. They all had quiescent pancolitis (Mayo 0-1) with long-term aminosalicylate treatment and ursodeoxycholic acid (8-20 mg/kg/d) used as potential chemopreventive agent against colorectal neoplasia. Eight of these 29 patients (27.6%) were diagnosed with rPSC after 60 (24-212) mo of follow-up after OLT [$P = 0.825$; odds ratio (OR): 0.76, 95% confidence interval (CI): 0.12-5.01].

De novo colitis was diagnosed in 12 patients (25.5%) a median of 45 (17-87) mo after OLT. This patient subgroup had a high prevalence of rPSC, confirmed in 11 of the 12 (91.7%) individuals a median of 72 (12-180) mo after OLT. Only two patients were diagnosed with rPSC prior to diagnosis of IBD. Univariate analysis identified *de novo* IBD as a highly significant risk factor for rPSC ($P = 0.011$; OR: 22, 95%CI: 1.54-314.31) and, in line with that, recurrence-free survival was substantially ($P \leq 0.001$) higher in patients with pre-OLT IBD (median 212 mo, 95%CI: 118-212) compared with *de novo* IBD patients (median 72 mo, 95%CI: 36-95) (Figure 3). Two of six patients with no evidence of IBD before or after OLT had rPSC ($P = 0.678$). All patients with *de novo* IBD were initially treated with mesalazine complementary to their immunosuppressive treatment.

Table 2 Univariate analysis of risk factors for recurrent primary sclerosing cholangitis *n* (%)

	Total (<i>n</i> = 47)	rPSC (<i>n</i> = 21)	No rPSC (<i>n</i> = 26)	<i>P</i> value
<i>De novo</i> IBD post-OLT	12 (25.5)	11 (91.7)	1 (8.3)	0.011
IBD pre-OLT	29 (61.7)	8 (27.6)	21 (72.4)	0.825
No colitis (pre-OLT or post-OLT)	6 (12.8)	2 (33.3)	4 (66.7)	0.678
Median age, recipient, yr (range)	36 (12-60)	35 (12-60)	38 (20-60)	0.337
Median age, donor, yr (range)	37 (11-61)	37 (11-60)	40.5 (13-61)	0.245
Male; female, recipient	31; 16 (66.0; 34.0)	12; 9 (38.7; 56.3)	19; 7 (61.3; 43.8)	0.355
Male; female, donor	24; 23 (51.1; 48.9)	13; 8 (54.2; 34.8)	11; 15 (45.8; 65.2)	0.244
Sex mismatch	23 (48.9)	11 (47.8)	12 (52.2)	0.773
MELD score at time of OLT (range)	15 (6-32)	15 (8-30)	15 (6-32)	0.773
History of ACR	25 (53.2)	14 (56.0)	11 (44.0)	0.114
Multiple episodes of ACR	12 (25.5)	7 (58.3)	5 (41.7)	0.326
Corticosteroid-resistant ACR	6 (12.8)	3 (50.0)	3 (50.0)	0.665
ACR treated with OKT3	4 (8.5)	3 (75.0)	1 (25.0)	0.615
ACR treated with ATG	2 (4.3)	0 (0)	2 (100)	0.163
CMV IgG positivity, recipient	27 (57.5)	12 (44.4)	15 (55.6)	1.000
CMV IgG positivity, donor	36 (76.6)	18 (50.0)	18 (50.0)	0.300
Corticosteroid administration \geq 3 mo post-OLT	43 (91.5)	18 (41.9)	25 (58.1)	0.311
Corticosteroid administration \geq 6 mo post-OLT	41 (87.2)	17 (41.5)	24 (58.5)	0.386
Corticosteroid administration \geq 3 mo post-OLT with dose \geq 10 mg prednisone	28 (59.6)	14 (50.0)	14 (50.0)	0.551
Corticosteroid administration \geq 6 mo post-OLT with dose \geq 10 mg prednisone	13 (27.7)	5 (68.5)	8 (61.5)	0.747
Overlap with AIH pre-OLT	5 (10.6)	5 (100)	0 (0)	0.013
Type of anastomosis: End-to-end; Roux-en-Y	7; 40 (14.9; 85.1)	4; 17 (57.1; 42.5)	3; 23 (42.9; 57.5)	0.684
Liver steatosis, donor	11 (23.4)	6 (54.6)	5 (45.5)	0.505
Cold ischemia median time, min (range)	320 (175-637)	315 (206-618)	324 (175-637)	0.627

rPSC: Recurrent primary sclerosing cholangitis; OLT: Orthotopic liver transplantation; ATG: (Rabbit) antithymocyte globulin; AIH: Autoimmune hepatitis; IBD: Inflammatory bowel disease; ACR: Acute cellular rejection; CMV: Cytomegalovirus.

None of our patients received biologics after OLT.

All five patients with PSC/AIH confirmed in the liver explant or with evidence pre-OLT had rPSC ($P < 0.05$), which occurred a median of 72 (61-118) mo after OLT.

We did not find a difference in time to rPSC between patients using cyclosporine and those using tacrolimus as primary immunosuppressant ($P = 0.320$; Figure 4).

*HLA-DRB1** typing results were available for 46 recipients and 40 donors (Table 3). *HLA-DQB1** was typed post hoc (for the purpose of this study) from frozen blood samples, which allowed retrieval of the *HLA-DQB1** profile of 35 donors and 41 recipients (Table 3). The presence of a donor *HLA-DRB1**07 allele was positively associated with rPSC in 10/15 (66.6%) cases ($P = 0.050$; OR: 4.25, 95%CI: 1.09-16.61).

None of the six recipients with *HLA-DRB1**04 developed rPSC ($P = 0.029$). Probably because of linkage disequilibrium with the *HLA-DRB1**04 allele, the presence of the *HLA-DQB1**03 allele in recipients was protective, as only one of 12 patients with this variant had rPSC ($P = 0.030$; OR: 0.1, 95%CI: 0.01-0.88). These results were duplicated in the *HLA-DQB1**07 subgroup: no recipient with this allele ($n = 7$) had rPSC ($P = 0.031$). Similarly, no recipient with *HLA-DQB1**08 had rPSC. However, this variant did not reach statistical significance ($P = 0.140$) because of the small number of cases ($n = 4$). Other *HLA-DR* or *-DQ* variants, as well as the number of donor and recipient DR and DQ mismatches, were not associated with rPSC.

Risk factors for rPSC-multivariate analysis

Cox proportional hazards regression model for recur-

rence time confirmed that *de novo* colitis after OLT is strongly associated with rPSC ($P = 0.014$), with a HR of 4.02 (95%CI: 1.58-10.98). The model also revealed the occurrence of rPSC to be positively correlated with history of ACR ($P = 0.044$; HR: 2.66, 95%CI: 1.03-7.86).

DISCUSSION

In this single-center study of carefully selected patients with long-term follow-up, we confirmed that IBD has an impact on rPSC. To our knowledge, this study is the first to demonstrate that patients with *de novo* IBD are at significantly higher risk of rPSC than those with IBD pre-OLT. Furthermore, the study confirms the association between ACR and rPSC.

The study represents the longest reported median (122 mo) and maximum (249 mo) follow-up after OLT for PSC.

Study limitations include its retrospective design, but the reliability of the outcome data was increased by care in choosing and adhering to the eligibility criteria, which included evaluation by magnetic resonance or endoscopic retrograde cholangiopancreatography (MRCP/ERCP), biopsy, and annual colonoscopy in all participants. The most obvious limitation of the study is its small sample size, which was a result of meticulous selection of study subjects based on thorough inclusion criteria: only patients with well-preserved colons, proper colonoscopic evaluation before OLT, and follow-up of more than 60 mo were included in the analysis. This approach allowed us to specifically study the influence of IBD on rPSC onset.

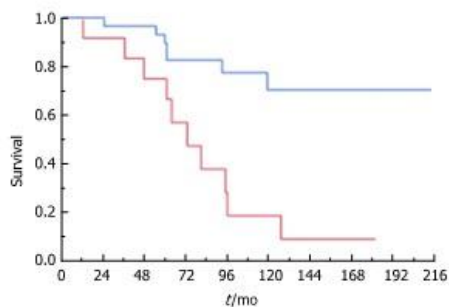


Figure 3 Kaplan-Meier plots of recurrent primary sclerosing cholangitis-free survival in patients with pre-orthotopic liver transplantation inflammatory bowel disease (blue line) and *de novo* inflammatory bowel disease (red line).

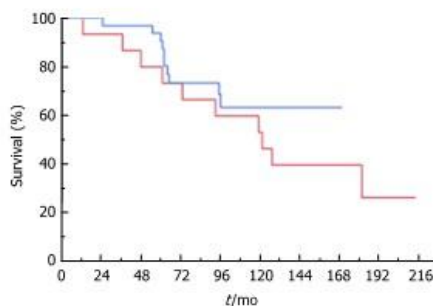


Figure 4 Distribution of time to recurrent primary sclerosing cholangitis in patients with cyclosporine immunosuppression (red line) vs tacrolimus immunosuppression (blue line).

In all other aspects, our patient cohort and diagnostics of rPSC were comparable to other published studies. Our study had a single-center design, yet the center is a tertiary care institution that includes more than half of all the transplanted PSC patients in the Czech Republic. This allows the results to be generalized to the broad population, where PSC represents the third leading cause of OLT, accounting for almost 11% of all transplanted patients.

The rate of rPSC occurrence in our study was 44.7%, which is higher than that observed elsewhere; for example, the large study by Ravikumar *et al.*^[27] reported only 14.3%. The diagnosis of rPSC in this study was careful, based on MRCP/ERCP and a standard liver biopsy protocol together with clinical signs. That such an approach led to more cases of rPSC being diagnosed suggests that the prevalence of rPSC might be highly underestimated. This is supported by the results of a recent Nordic multicenter study that reported a higher frequency of rPSC in the center that had an established protocol for routine MRCP assessment^[29]. The relatively long follow-up in our cohort is another plausible explanation for the observed rPSC rate.

Long-term (15-years) graft survival in all patients

transplanted for PSC (84.6%) and in the analyzed cohort (86.2%) did not differ significantly. However, six out of seven retransplants in our study cohort were performed for rPSC, which supports the previous observation that rPSC is associated with high risk of graft failure^[13]. Furthermore, *de novo* IBD was recognized by Kochhar *et al.*^[34] as an important risk factor for re-OLT.

In this study, rPSC was diagnosed in the vast majority (91.7%) of patients with *de novo* colitis. Strikingly, recurrence-free survival was substantially ($P \leq 0.001$) lower in patients with *de novo* IBD compared with those with colitis confirmed pre-OLT. In the study published by Ravikumar *et al.*^[27] the frequency of rPSC associated with *de novo* colitis was 25%, which is less than in our study but almost double the rPSC rate in the entire study group (25% vs 14.3%). Therefore, the ratio of rPSC in the *de novo* colitis group to rPSC in the entire study group was similar to the ratio in our study (91.7% vs 44.7%).

According to current knowledge on the subject, approximately 14%-30% of patients with PSC may develop *de novo* IBD during the 10-year period after OLT^[35]. This is consistent with our study: *De novo* colitis was diagnosed in 25.5% of patients after a median of 45 (17-87) mo post-OLT. Apart from in two patients, *de novo* colitis was diagnosed prior to rPSC, which might be interpreted as study error because evaluations for rPSC and *de novo* IBD were performed at different times during follow-up. The etiopathogenesis of rPSC is not well understood, but it can be assumed (and presented data support this) that the gut-liver axis plays a crucial role. Pathogenesis of *de novo* IBD also remains poorly understood. However, Kochhar *et al.*^[34] suggested that OLT may reset the "immune thermostat" and trigger the development of bowel disease. Many other factors, including alteration of gut microbiota, gut infections (such as CMV), or use of immunosuppressant agents, may also be involved^[36,37]. High incidence of *de novo* colitis and its tight association with rPSC suggest that regular (maybe even annual) routine colonoscopy after OLT for PSC should be performed in patients with no history of IBD.

The risk of liver graft failure after OLT might be associated with not only the presence but also the activity of IBD^[30]. However, available data on the role of IBD activity are not consistent^[29,38]. As all patients in our study group experienced quiescent pancolitis before OLT, we were not able to determine whether IBD activity had an impact on increased risk of rPSC.

The role of preventive colectomy has been discussed before, as it may significantly reduce the risk of both colon cancer and rPSC^[26,38]. This was further supported by the recent Nordic multicenter study by Lindstrom *et al.*^[29], which identified proctocolectomy as a protective factor against rPSC even in the multivariate analysis. However, the association did not appear as strong in the study by Hildebrand *et al.*^[17], in which 13.3% of colectomy patients and 19.2% of patients without colectomy had rPSC. Our total population included only three patients who underwent colectomy prior to OLT. As the number

Table 3 Human leukocyte antigen-*DRB1** and human leukocyte antigen-*DQB1** alleles in donors and recipients, association with recurrent primary sclerosing cholangitis *n* (%)

	Donor	rPSC	<i>P</i> value	Recipient	rPSC	<i>P</i> value
<i>HLA-DRB1</i> *						
1	5	2 (40.0)	1.000	9	3 (33.3)	0.711
3	7	2 (28.6)	0.427	23	11 (47.8)	0.767
4	9	4 (44.4)	1.000	6	0 (0)	0.029
5	1	1 (100)	0.450			
6	2	2 (100)	0.196			
7	15	10 (66.7)	0.050	2	0 (0)	0.498
8	2	1 (50.0)	1.000			
9	1	0 (0)	1.000	1	1 (100)	0.435
10				1	1 (100)	0.435
11	10	4 (40.0)	1.000	5	1 (20.0)	0.369
12	2	2 (100)	0.196	1	1 (100)	0.435
13	8	2 (25.0)	0.258	10	5 (50.0)	0.726
14	4	0 (0)	0.114	1	1 (100)	0.435
15	8	3 (37.5)	0.709	15	5 (33.3)	0.365
16	1	1 (100)	0.450	3	2 (66.7)	0.572
<i>HLA-DQB1</i> *						
2	17	9 (53.0)	0.740	25	10 (40.0)	1.000
3	20	8 (40.0)	0.740	11	1 (9.1)	0.030
7	15	6 (40.0)	0.500	7	0 (0)	0.031
8	7	5 (71.4)	0.229	4	0 (0)	0.140
9	2	1 (50.0)	1.000	1	1 (100)	0.395
4	2	1 (50.0)	1.000			
5	9	4 (44.4)	1.000	10	5 (50.0)	0.481
6	13	4 (30.8)	0.164	21	9 (42.9)	0.760

rPSC: Recurrent primary sclerosing cholangitis.

was too low to yield any meaningful results, we did not include these patients in the study, preferring to maintain the homogeneity of the study cohort by adding a history of colorectal surgery to the exclusion criteria. Nevertheless, given current knowledge on the topic, proctocolectomy should be considered when evaluating patients with rPSC and concomitant active colitis for re-OLT.

Association between ACR and rPSC has previously been described in several studies^[8,19,28]. Multivariate analysis in our cohort identified history of ACR (regardless of number of episodes) as a significant risk factor for rPSC. Neither steroid-resistant ACR nor history of multiple ACR episodes were associated with rPSC. The pathogenetic link between ACR and rPSC remains unresolved. It has been proposed that long-lived memory T-cells may be recruited from the gut due to onset of alloreactive response^[39] or that administration of aggressive immunosuppression during rejection treatment might accelerate reactivity against unknown antigens^[38]. Given that pathogenesis of rPSC is likely to have similar mechanisms to the primary disease, it is not yet possible to give a credible interpretation to the value of this relationship between ACR and rPSC.

Interestingly, all five patients with overlapping features of AIH developed rPSC and this association was statistically significant in the univariate analysis. This observation is consistent with a previous study that confirmed an increased probability of disease recurrence in PSC patients with overlapping features of AIH when compared with

a single autoimmune disease^[40]. However, there were too few PSC/AIH patients in our cohort to draw any firm conclusions.

Assuming that genetic predisposition might be involved in rPSC (and PSC) pathogenesis, we performed *HLA-DRB1** and *HLA-DQB1** patient and donor typing and included the results in the univariate analysis. The presence of a donor *HLA-DRB1**07 allele was associated with elevated risk of rPSC. Interestingly, no recipient with the *HLA-DRB1**04 allele developed rPSC. Our analysis suggests that the *HLA-DQB1**03 allele might also have a protective effect; however, the separate influence of the *DRB1**04 and *DQB1**03 alleles will have to be determined in future studies. The protective role that the *DQB1**08 allele is believed to play remains to be confirmed because of the relatively small number of *DQB1**08-positive individuals in our cohort. The presence of *HLA-DRB1**08 was associated with increased risk of rPSC by Alexander *et al*^[22], suggesting an immunological mechanism for rPSC, but we could not support that observation. Even though we did not eventually include HLA variants in the multivariate analysis because of our low sample size, these results suggest that routine HLA assessment in OLT is of use.

In summary, all previous studies in the field of rPSC have had a retrospective design and rather inconsistent results, which include the uncertain role of immunosuppressive therapy. Several studies suggested an association of tacrolimus with both rPSC and *de novo* IBD^[29,30,37], however, the effect of immunosuppression

on rPSC is hard to interpret. The cyclosporine-based immunosuppressive protocol used at our institute was changed to a tacrolimus-based regimen during the follow-up period, but patients who were benefiting from cyclosporine were kept on that drug. We did not find a difference in PSC recurrence time distribution between cyclosporine-based and tacrolimus-based immunosuppression ($P = 0.320$). Furthermore, we were unable to assess the influence of ursodeoxycholic acid as it was given to all patients with PSC, in accordance with our center's policy.

In conclusion, *de novo* IBD and history of ACR significantly increase the risk of PSC recurrence after liver transplantation. This association is so close that careful monitoring of patients at risk is critical. Systematic prospective studies are needed to evaluate the role of *de novo* colitis and the influence of different types of therapy, including biologics, on rPSC rate and risk of graft failure. Proper HLA matching of donors and recipients might be another tool to help avoid development of rPSC, at least in high-risk patients. As rPSC seems likely to be highly underdiagnosed, establishing algorithms for protocolary use of MRCP is justified.

ARTICLE HIGHLIGHTS

Research background

Recurrence of primary sclerosing cholangitis (rPSC) is the most common cause of liver graft failure in patients after liver transplantation (OLT) for PSC. Many previous studies aimed to identify risk factors associated with rPSC. However, results of these studies were often incoherent or even contradictory. This single-center study describes potential risk factors for rPSC in thoroughly selected cohort of patients with longest median and maximum follow-up presented up-to-date.

Research motivation

Identifying relevant risk factors for rPSC is a cornerstone for proper stratification of PSC patients in both pre-OLT and post-OLT arrangement. In the future, this should lead to establishing tailored examination and therapeutic (e.g., immunosuppression regimens) protocols, especially for high-risk individuals. Such measures could reduce morbidity and mortality in patients with this serious clinical condition.

Research objectives

Principal objective of this study was to determine which clinical features are significantly predisposed towards rPSC development. As there was no other study on the topic previously performed in Central Europe, the aim was to assess the outcomes after over twenty years of experience with liver transplantation in our center. Identification of risk factors for rPSC will surely direct future research in the field of recurrent disease pathogenesis.

Research methods

As this is a study with retrospective design, we analysed all available relevant medical records of patients included in the study while sticking with strict inclusion and exclusion criteria. Standard statistical methods were used to determine significance of obtained results. This included two-tailed Fisher's exact test, Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test, analysis by Kaplan-Meier method (with subsequent log-rank test) and Cox proportional hazards regression model.

Research results

The most novel finding of this study is represented by very tight association of rPSC and *de novo* inflammatory bowel disease after OLT. In accordance

with several previous studies, we also demonstrated that patients with history of acute cellular rejection after OLT are also at increased risk of rPSC development, similarly as patients with overlapping features of autoimmune hepatitis pre-OLT. Moreover, several human leukocyte antigen (HLA)-DR and HLA-DQ alleles appeared to be promising markers in assessing the risk of rPSC. To confirm these findings, performing of large-scale prospective study would be highly warranted.

Research conclusions

Despite the fact, that previous studies described association of IBD and rPSC, this is the first study demonstrating that patients with *de novo* colitis are at significantly higher risk of rPSC as compared to patients with IBD diagnosed pre-OLT. The work also demonstrates that those who experienced ACR after OLT should be under careful surveillance for signs of rPSC. Moreover, presence of several HLA-DR and HLA-DQ alleles in both donors and recipients had a clear tendency to increase or decrease the risk of PSC. Therefore, routine HLA assessment could lead to more careful donor selection or at least to stratifying the patients for the risk of rPSC development. Routine MRCP should be considered in all those transplanted for PSC as rPSC seems to be highly underdiagnosed. High incidence of *de novo* colitis raises a question regarding more frequent endoscopic evaluation of patients with no previous history of IBD.

Research perspectives

Presented study brings special attention to poorly defined clinical entity of *de novo* colitis after liver transplantation and its tight relation to PSC recurrence in the liver graft. Future basic and clinical research should define pathogenetic link between both entities and provide diagnostic algorithms and treatment protocols for both these important clinical conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Vera Lanska for her supervision of the statistical analysis performed in this study.

REFERENCES

- Chapman RW, Arborgh BA, Rhodes JM, Summerfield JA, Dick R, Scheuer PJ, Sherlock S. Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. *Gut* 1980; **21**: 870-877 [PMID: 7439807 DOI: 10.1136/gut.21.10.870]
- Gow PJ, Chapman RW. Liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Liver* 2000; **20**: 97-103 [PMID: 10847476 DOI: 10.1034/j.1600-0676.2000.020002097.x]
- Levy C, Lindor KD. Primary sclerosing cholangitis: epidemiology, natural history, and prognosis. *Semin Liver Dis* 2006; **26**: 22-30 [PMID: 16496230 DOI: 10.1055/s-2006-933560]
- Karlsen TH, Schrumpf E, Bøberg KM. Update on primary sclerosing cholangitis. *Dig Liver Dis* 2010; **42**: 390-400 [PMID: 20172772 DOI: 10.1016/j.dld.2010.01.011]
- Broomé U, Olsson R, Lööf L, Bodemar G, Hultcrantz R, Danielsson A, Prytz H, Sandberg-Gertzén H, Wallerstedt S, Lindberg G. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996; **38**: 610-615 [PMID: 8707097 DOI: 10.1136/gut.38.4.610]
- Loftus EV Jr, Harewood GC, Loftus CG, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Jewell DA, Sandborn WJ. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2005; **54**: 91-96 [PMID: 15591511 DOI: 10.1136/gut.2004.046615]
- Boonstra K, van Erpecum KJ, van Nieuwkerk KM, Drenth JP, Poen AC, Witteman BJ, Tuynman HA, Beuers U, Ponsioen CY. Primary sclerosing cholangitis is associated with a distinct phenotype of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; **18**: 2270-2276 [PMID: 22407885 DOI: 10.1002/ibd.22938]
- Moncrief KJ, Savu A, Ma MM, Bain VG, Wong WW, Tandon P. The natural history of inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis after liver transplantation--a single-centre experience. *Can J Gastroenterol* 2010; **24**: 40-46 [PMID: 20172772 DOI: 10.1016/j.dld.2010.01.011]

- 20186355 DOI: 10.1155/2010/830291]
- 9 **Adam R**, Hoti E. Liver transplantation: the current situation. *Semin Liver Dis* 2009; **29**: 3-18 [PMID: 19235656 DOI: 10.1055/s-0029-1192052]
 - 10 **Adam R**, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, Neuhaus P, Lerut J, Salizzoni M, Pollard S, Muhlbacher F, Rogiers X, Garcia Valdecasas JC, Berenguer J, Jaeck D, Moreno Gonzalez E: European Liver Transplant Association. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2003; **9**: 1231-1243 [PMID: 14625822 DOI: 10.1016/j.lts.2003.09.018]
 - 11 **Graziadei IW**, Wiesner RH, Marotta PJ, Porayko MK, Hay JE, Charlton MR, Poterucha JJ, Rosen CB, Gores GJ, LaRusso NF, Krom RA. Long-term results of patients undergoing liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1999; **30**: 1121-1127 [PMID: 10534330 DOI: 10.1002/hep.510300501]
 - 12 **Vera A**, Moledina S, Gunson B, Hubscher S, Mirza D, Olliff S, Neuberger J. Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis of liver allograft. *Lancet* 2002; **360**: 1943-1944 [PMID: 12493264 DOI: 10.1016/S0140-6736(02)11861-7]
 - 13 **Rowe IA**, Webb K, Gunson BK, Mehta N, Haque S, Neuberger J. The impact of disease recurrence on graft survival following liver transplantation: a single centre experience. *Transpl Int* 2008; **21**: 459-465 [PMID: 18225996 DOI: 10.1111/j.1432-2277.2007.00628.x]
 - 14 **Fosby B**, Karlsen TH, Melum E. Recurrence and rejection in liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 1-15 [PMID: 22228965 DOI: 10.3748/wjg.v18.i1.1]
 - 15 **Lerut J**, Demetris AJ, Stieber AC, Marsh JW, Gordon RD, Esquivel CO, Iwatsuki S, Starzl TE. Intrahepatic bile duct strictures after human orthotopic liver transplantation. Recurrence of primary sclerosing cholangitis or unusual presentation of allograft rejection? *Transpl Int* 1988; **1**: 127-130 [PMID: 3075471 DOI: 10.1111/j.1432-2277.1988.tb01799.x]
 - 16 **Graziadei IW**, Wiesner RH, Batts KP, Marotta PJ, LaRusso NF, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, Charlton MR, Ludwig J, Poterucha JJ, Steers JL, Krom RA. Recurrence of primary sclerosing cholangitis following liver transplantation. *Hepatology* 1999; **29**: 1050-1056 [PMID: 10094945 DOI: 10.1002/hep.510290427]
 - 17 **Hildebrand T**, Pannicke N, Dechene A, Gotthardt DN, Kirchner G, Reiter FP, Sterneck M, Herzer K, Lenzen H, Rupp C, Barg-Hock H, de Leuw P, Teufel A, Zimmer V, Lammert F, Sarrazin C, Spengler U, Rust C, Manns MP, Strassburg CP, Schramm C, Weismüller TJ; German PSC Study Group. Biliary strictures and recurrence after liver transplantation for primary sclerosing cholangitis: A retrospective multicenter analysis. *Liver Transpl* 2016; **22**: 42-52 [PMID: 26438008 DOI: 10.1002/lt.24350]
 - 18 **Khettry U**, Keaveny A, Goldar-Najafi A, Lewis WD, Pomfret EA, Pomposelli JJ, Jenkins RL, Gordon FD. Liver transplantation for primary sclerosing cholangitis: a long-term clinicopathologic study. *Hum Pathol* 2003; **34**: 1127-1136 [PMID: 14652814 DOI: 10.1053/j.humpath.2003.07.015]
 - 19 **Jeyarajah DR**, Netto GJ, Lee SP, Testa G, Abbasoglu O, Husberg BS, Levy MF, Goldstein RM, Gonwa TA, Tillery GW, Crippin JS, Klintmalm GB. Recurrent primary sclerosing cholangitis after orthotopic liver transplantation: is chronic rejection part of the disease process? *Transplantation* 1998; **66**: 1300-1306 [PMID: 9846512 DOI: 10.1097/00007890-199811270-00006]
 - 20 **Egawa H**, Taira K, Teramukai S, Haga H, Ueda Y, Yonezawa A, Masuda S, Tsuji H, Ashihara E, Takada Y, Uemoto S. Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after living donor liver transplantation: a single center experience. *Dig Dis Sci* 2009; **54**: 1347-1354 [PMID: 19267192 DOI: 10.1007/s10620-009-0773-9]
 - 21 **Haga H**, Miyagawa-Hayashino A, Taira K, Morioka D, Egawa H, Takada Y, Manabe T, Uemoto S. Histological recurrence of autoimmune liver diseases after living-donor liver transplantation. *Hepatol Res* 2007; **37** Suppl 3: S463-S469 [PMID: 17931204 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00245.x]
 - 22 **Alexander J**, Lord JD, Yeh MM, Cuevas C, Bakthavatsalam R, Kowdley KV. Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2008; **14**: 245-251 [PMID: 18236405 DOI: 10.1002/lt.21394]
 - 23 **Brandsaeter B**, Schrupp E, Bentsdal O, Brabrand K, Smith HJ, Abildgaard A, Clausen OP, Bjoro K. Recurrent primary sclerosing cholangitis after liver transplantation: a magnetic resonance cholangiography study with analyses of predictive factors. *Liver Transpl* 2005; **11**: 1361-1369 [PMID: 16184522 DOI: 10.1002/lt.20444]
 - 24 **Kugelman M**, Spiegelman P, Osgood MJ, Young DA, Trotter JF, Steinberg T, Wachs ME, Bak T, Kam I, Everson GT. Different immunosuppressive regimens and recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; **9**: 727-732 [PMID: 12827560 DOI: 10.1053/jlts.2003.50143]
 - 25 **Campsen J**, Zimmerman MA, Trotter JF, Wachs M, Bak T, Steinberg T, Kam I. Clinically recurrent primary sclerosing cholangitis following liver transplantation: a time course. *Liver Transpl* 2008; **14**: 181-185 [PMID: 18236392 DOI: 10.1002/lt.21313]
 - 26 **Cholongitas E**, Shusang V, Papatheodoridis GV, Marelli L, Manousou P, Rolando N, Patch D, Rolles K, Davidson B, Burroughs AK. Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2008; **14**: 138-143 [PMID: 18236447 DOI: 10.1002/lt.21260]
 - 27 **Ravikumar R**, Tsochatzis E, Jose S, Allison M, Athale A, Creamer F, Gunson B, Iyer V, Madanur M, Manas D, Monaco A, Mirza D, Owen N, Roberts K, Sen G, Srinivasan P, Wigmore S, Fusai G, Fernando B, Burroughs A. Risk factors for recurrent primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *J Hepatol* 2015; **63**: 1139-1146 [PMID: 26186988 DOI: 10.1016/j.jhep.2015.07.005]
 - 28 **Alabraba E**, Nightingale P, Gunson B, Hubscher S, Olliff S, Mirza D, Neuberger J. A re-evaluation of the risk factors for the recurrence of primary sclerosing cholangitis in liver allografts. *Liver Transpl* 2009; **15**: 330-340 [PMID: 19243003 DOI: 10.1002/lt.21679]
 - 29 **Lindström L**, Jørgensen KK, Bøberg KM, Castedal M, Rasmussen A, Rostved AA, Isoniemi H, Bottai M, Bergquist A. Risk factors and prognosis for recurrent primary sclerosing cholangitis after liver transplantation: a Nordic Multicentre Study. *Scand J Gastroenterol* 2018; **53**: 297-304 [PMID: 29301479 DOI: 10.1080/00365521.2017.1421705]
 - 30 **Joshi D**, Bjarnason I, Belgaumkar A, O'Grady J, Suddle A, Heneghan MA, Aluvihare V, Rela M, Heaton N, Agarwal K. The impact of inflammatory bowel disease post-liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Liver Int* 2013; **33**: 53-61 [PMID: 22103794 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02677.x]
 - 31 **Ueda Y**, Kaido T, Okajima H, Hata K, Anazawa T, Yoshizawa A, Yagi S, Taura K, Masui T, Yamashiki N, Haga H, Nagao M, Marusawa H, Seno H, Uemoto S. Long-term Prognosis and Recurrence of Primary Sclerosing Cholangitis After Liver Transplantation: A Single-Center Experience. *Transplant Direct* 2017; **3**: e334 [PMID: 29536035 DOI: 10.1097/TXD.0000000000000751]
 - 32 **Gautam M**, Cheruvattath R, Balan V. Recurrence of autoimmune liver disease after liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl* 2006; **12**: 1813-1824 [PMID: 17031826 DOI: 10.1002/lt.20910]
 - 33 **Schroeder KW**, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987; **317**: 1625-1629 [PMID: 3317057 DOI: 10.1056/NEJM198712243172603]
 - 34 **Kochhar G**, Singh T, Dust H, Lopez R, McCullough AJ, Liu X, Fung J, Shen B. Impact of De Novo and Preexisting Inflammatory Bowel Disease on the Outcome of Orthotopic Liver Transplantation. *Inflamm Bowel Dis* 2016; **22**: 1670-1678 [PMID: 27306073 DOI: 10.1097/MIB.0000000000000830]
 - 35 **Singh S**, Loftus EV Jr, Talwalkar JA. Inflammatory bowel disease after liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2013; **108**: 1417-1425 [PMID: 23896954 DOI: 10.1038/ajg.2013.163]

- 36 **Vindigni SM**, Surawicz CM. The gut microbiome: a clinically significant player in transplantation? *Expert Rev Clin Immunol* 2015; **11**: 781-783 [PMID: 26065325 DOI: 10.1586/1744666X.2015.1043894]
- 37 **Verdonk RC**, Dijkstra G, Haagsma EB, Shostrom VK, Van den Berg AP, Kleibeuker JH, Langnas AN, Sudan DL. Inflammatory bowel disease after liver transplantation: risk factors for recurrence and de novo disease. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1422-1429 [PMID: 16686766 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01333.x]
- 38 **Montano-Loza AJ**, Bhanji RA, Wasilenko S, Mason AL. Systematic review: recurrent autoimmune liver diseases after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; **45**: 485-500 [PMID: 27957759 DOI: 10.1111/apt.13894]
- 39 **Eksteen B**, Grant AJ, Miles A, Curbishley SM, Lalor PF, Hübscher SG, Briskin M, Salmon M, Adams DH. Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis. *J Exp Med* 2004; **200**: 1511-1517 [PMID: 15557349 DOI: 10.1084/jem.20041035]
- 40 **Bhanji RA**, Mason AL, Girgis S, Montano-Loza AJ. Liver transplantation for overlap syndromes of autoimmune liver diseases. *Liver Int* 2013; **33**: 210-219 [PMID: 23146117 DOI: 10.1111/liv.12027]

P-Reviewer: Chu J, Mercado MA, Yuksel I **S-Editor:** Wang XJ
L-Editor: A **E-Editor:** Bian YN



PUBLIKACE 7

Kolorektální karcinom u idiopatických střevních zánětů

Prof. MUDr. Julius Špičák, CSc., MUDr. Lukáš Bajer
Institut klinické a experimentální medicíny, Klinika hepatogastroenterologie

Souhrn

Nemocní s idiopatickými střevními záněty jsou ve zvýšené míře ohroženi vznikem dysplazií a kolorektálního karcinomu. Mezi rizikové faktory patří délka trvání onemocnění, jeho rozsah a aktivita, pozitivní rodinná anamnéza a současná primární sklerozující cholangitida. Hlavní úlohu v patogenezi kolorektálních neoplazií u idiopatických střevních zánětů hraje zánět a s ním související biomolekulární procesy. U nemocných s rozsáhlým postižením se doporučuje zahájit screening osm let od první manifestace onemocnění, v případě mírného izolovaného postižení rektu screening není nutný. Podle individuálního rizika se doporučuje opakovat vyšetření v jednorocích až pětiletých intervalech. Standardní technikou je v současné době chromoendoskopie, světelné manipulace typu NBI naplnily očekávání. Alternativou jsou mnohočetné etážové biopsie, vždy je třeba biopsovat všechny podezřelé struktury. Diagnóza dysplazie by měla být vždy potvrzena alespoň dvěma patologi. Prioritou v léčbě viditelných novotvarů je endoskopické odstranění technikou polypektomie, mukosektomie či disekce. U vícečetné dysplazie nízkého stupně detekované naslepo a jakékoli dysplazie neodstranitelné spolehlivě endoskopicky je indikována kolektomie. Při dlouhodobém podávání aminosalicylátů a kyseliny ursodeoxycholové byl prokázán chemoprotektivní efekt.

Klíčová slova

idiopatické střevní záněty • kolorektální karcinom • dysplazie

Summary

Spicak, J., Bajer, L. Colorectal carcinoma in patients with idiopathic bowel diseases

Patients with inflammatory bowel disease (IBD) are at increased risk of dysplasia and colorectal carcinoma (CRC) development. Duration, activity and extent of colitis are considered to be significant risk factors, as well as positive family history and concomitant primary sclerosing cholangitis. Inflammation and related biomolecular processes play a crucial role in IBD-associated neoplasia pathogenesis. In patients with extensive colitis, it is recommended to begin the screening programme

after 8 years from the disease onset. In case of isolated mild proctitis, screening is not necessary. Time interval between the examinations is usually 1–5 years according to individual risk. Chromoendoscopy became the method of choice, while optical manipulation, i.e. techniques like NBI, did not live up to expectations. An alternative approach multiple random biopsies remain and should always be followed by targeted biopsies of suspicious lesions. Diagnosis of dysplasia should be confirmed by second pathologist. When possible, visible lesions should be treated endoscopically by polypectomy, mucosectomy or dissection. High-grade dysplasia or multiple low-grade dysplasia in random biopsies should lead to proctocolectomy, as well as non-adenoma-like lesions not suitable for endoscopic treatment. Long-term administration of aminosalicylates and ursodeoxycholic acid are proven to have a chemopreventive effect.

Key words

inflammatory bowel disease • colorectal carcinoma • dysplasia

Vztah idiopatických střevních zánětů (IBD) a kolorektálního karcinomu (KRK) popsali již v první polovině minulého století Crohn a Rosenberg,⁽¹⁾ a toto spojení bylo potvrzeno desítkami dalších studií, zejména u ulcerózní kolitidy (UC). KRK se od novotvarů sporadických liší jak svým biologickým chováním, tak i patogenezi. Častěji postihuje mladší věkové skupiny, rychleji progreduje, častěji vzniká v pravostřanném tračníku či multifokálně a jeho grading bývá nepříznivý již v době záchytu.⁽²⁾

Demografická data a rizikové faktory

Podle metaanalýzy zahrnující 116 původních studií činila prevalence KRK u UC 3,7 % (bez ohledu na charakter postižení).⁽³⁾ Podle studie Ekborna činila poměrná standardizovaná incidence (standardised incidence ratio – SIR) 5,7. Söderlund shledal v novější studii SIR 2,3, zatímco studie Winthera a Jesse zvýšené riziko neprokázaly.^(4, 5, 6) Významným rizikovým faktorem vzniku karcinomu je doba trvání onemocnění. Podle rozsáhlé prospektivní studie publikované v roce 2006 bylo kumulativní riziko rozvoje KRK v terénu chronické pankolitidy 2,5 % po 20 letech, 7,6 % po

pocta Zdeňku Mařatkovi

30 letech a 10,8 % po 40 letech trvání onemocnění. Recentní studie ukazují postupný pokles prevalence KRK u IBD, což je pravděpodobně dáno důslednějším screeningem a pokroky ve farmakoterapii.⁽⁷⁾ Podle metaanalýzy Castagno-Milly (81 studií) byla incidence KRK v první dekádě po stanovení diagnózy 0,91, ve druhé 4,07 a ve třetí 4,55 na 1000 let sledování jednoho pacienta. Incidence klesla ze 4,29 ve studiích publikovaných v 50. letech na 1,21 z údajů v poslední dekádě. Samotný typ idiopatického střevního zánětu (Crohnova choroba tlustého střeva vs. UC) nemá na riziko vzniku KRK zásadní vliv a je u obou základních typů srovnatelný.^(8, 9) Vznik KRK je však úzce vázán na rozsah kolitidy. Prokazatelně vyšší riziko vykazují zejména nemocní s pankolitidou a s pravostrannou kolitidou (v tomto případě zejména u primární sklerozující cholangitidy – PSC).^(10, 12) U nemocných s izolovaným postižením rektosigmatu naopak vyšší incidence KRK prokázána nebyla.⁽¹³⁾ Dalším rizikovým faktorem je dlouhodobě vysoká aktivita střevního zánětu, a to i u nemocných s klinicky kontrolovaným průběhem onemocnění.⁽⁴⁾ Prevalence KRK při současné PSC (tzv. fenotyp PSC – IBD) je přibližně 5,8 %^(14, 15) a riziko v porovnání s běžnou populací 5–9násobné.⁽¹⁶⁾ Kumulativní riziko vzniku KRK v horizontu 10, 20 a 25 let je zde 9 %, 31 %, resp. 50 %, což je podstatně více než u kolitidy (UC) samotné.⁽¹⁷⁾ Dalšími rizikovými faktory jsou přítomnost pozánětlivých polypů a striktur tlustého střeva, věk či pozitivní rodinná anamnéza IBD a/nebo KRK u příbuzných prvního stupně.^(18–20)

Patogeneze

Oproti sporadickému karcinomu, kde mají zásadní úlohu genetické predispozice a s věkem spojené vnější vlivy, hraje u s kolitidou asociovaného KRK klíčovou roli zánět. Jednotlivé patogenetické kroky jsou pro obě formy onkogeneze společné, liší se však významem i sekvencím načasováním.⁽²¹⁾

GENOVÉ MUTACE A EPIGENETIKA

Klíčovým momentem onkogeneze u IBD je alterace funkce proteinu p53 způsobená mutací genu TP53. Mutace tohoto genu byly pozorovány u až 85 % nemocných s kolitickým KRK, ale jsou ve více než 50 % detekovány i v zánětlivé sliznici bez neoplazie. Bývají vyjádřeny již před vznikem aneuploidie v časných stádiích tumorigeneze. Ztráta heterozygoty u TP53 byla detekována v 6 % biopsií z nedysplastické sliznice a u dysplazie nízkého stupně (Low Grade Dysplasia – LGD), dysplazie vysokého stupně (High-Grade Dysplasia – HGD) a KRK ve 33 %, v 63 %, resp. v 85 % případů. Tato tendence zřetelně koreluje s mírou morfologických maligních změn. Přítomnost mutací p53 v časných stádiích odlišuje tento typ od sporadických karcinomů, kde je p53 posledním nárazníkem před invazivním biologickým chováním neoplazie.^(22–24) K opačné situaci dochází u tumor-supresorového genu APC. Ztráta jeho heterozygoty je u sporadických karcinomů počátečním krokem tumorigeneze, zatímco u časných dysplastických změn v terénu kolitidy se vyskytuje jen v malé míře nebo zcela chybí. Nejvyšší frekvence (50 %) dosahuje u zvířecích modelů i u lidí až ve fázi invazivního karcinomu, a na rozdíl od sporadického karcinomu tedy souvisí spíše s progresí neoplazie než s jejím vznikem.^(25, 26)

Ke vzniku a rozvoji neoplazií u IBD také přispívají epigenetické faktory, z nichž nejzásadnější je metylace DNA. Metylace predilekce postihuje úseky s vysokou frekvencí nukleotidové sekvence C-G (cytosin-guanin), která je typická pro promo-

rové oblasti některých klíčových genů. Dalšími významnými epigenetickými mechanismy jsou např. modifikace histonů a interference RNA s microRNA.^(27, 28)

ROLE MIKROBIOTY

Střevní bakterie hrají podstatnou roli nejen v patogenezi zánětu, ale i neoplazií. Studie na zvířecích modelech ukazují, že při absenci některých specifických bakteriálních kmenů kolitida ani dysplazie nevznikají.⁽²⁹⁾ Ve studiích z roku 2003 např. *H. hepaticus* infikovaný do myšího střeva vyvolal rozvoj neoplazie (od LGD po invazivní adenokarcinom) ve 100 % případů, zatímco v jeho nepřítomnosti nádory nevznikly.⁽³⁰⁾ Transfer Treg buněk z takto stimulovaných myší navíc měl u recipientních myší protektivní efekt na vznik dysplazií i kolitidy prostřednictvím suprese prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-17, TNFα).⁽³¹⁾ Právě narušení rovnováhy mezi pro- a protizánětlivými faktory je důležitým principem iniciace patologických změn u dysbiózy (kvantitativní a kvalitativní změny ve složení mikrobioty). Významnou úlohu mohou mít i enterotoxiny produkované toxigenními kmeny komenzálních bakterií, jak dokládá studie na hlodavcích kolonizovaných toxin produkujícími či netoxigenními kmeny *B. fragilis*.⁽³²⁾ Ochranný efekt byl naopak popsán u *Bifidobacterium Laris*.⁽³³⁾

Klíčovou úlohu při vzniku střevního zánětu hrají toll-like receptory (TLR), které mohou být stimulovány bakteriálními patogeny a mohou stimulovat produkci volných biologicky aktivních radikálů, jak o tom svědčí skutečnost, že TLR4-deficientní myši vykazovaly nižší výskyt neoplazií v chemicky indukované kolitidě.⁽³⁴⁾

VOLNÉ RADIKÁLY

Chronické zánětlivé změny způsobují ve slizniční tkáni oxidativní stres, který zásadním způsobem zánětlivou aktivitu s karcinogenezi propojuje. Tento stres je součástí nespecifické obrany zprostředkované elementy vrozené buněčné imunity, zejména granulocyty a makrofágy. Následné pochody účinně likvidují slizniční patogeny, ale zároveň způsobují významnou alteraci střevního epitelu. Reaktivní formy kyslíku a dusíku ovlivňují celou řadu metabolických procesů a jejich aktivita je spojena se vznikem četných genových mutací, zejména v oblasti telomer. Přímá či nepřímá inhibice oxidativního stresu proto v experimentálních modelech vedla k poklesu vzniku a rozvoje neoplazií.^(35–37)

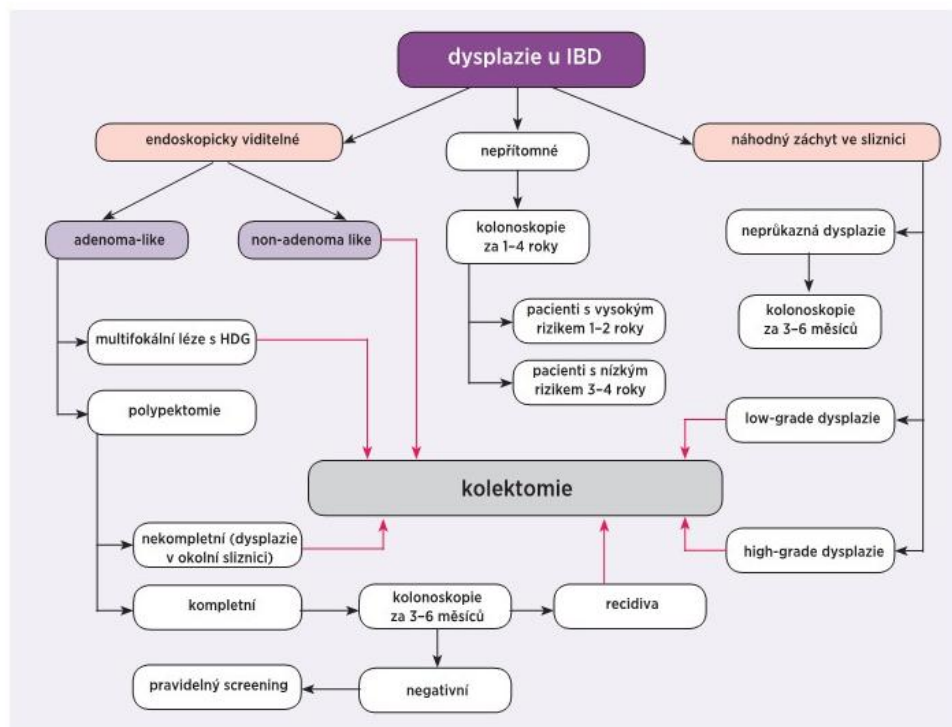
CYTOKINY A SIGNALIZAČNÍ KASKÁDY

Transkripční a růstové faktory, chemokiny a cytokiny jsou jedněmi ze solubilních faktorů účastnících se jak patogeneze, tak i onkogeneze zánětu. Jejich ovlivňování je dnes hybnou silou moderní farmakoterapie idiopatických střevních zánětů. V této souvislosti nejvyužívanějším cytokinem je tumor-necrosis factor α (TNFα). Jeho účast na prozánětlivých dějích z něj udělala atraktivní cíl pro biologickou terapii, která se v klinické praxi již mnoho let používá (např. infliximab či adalimumab).⁽³⁸⁾ Mnoho buněk imunitního systému secernuje TNFα, nicméně jeho majoritním producentem v zánětlivých lokalizacích jsou makrofágy. Indukcí proliferace, angiogeneze a alterace DNA indukuje v terénu zánětu TNFα také karcinogenezi. Dalším důležitým solubilním faktorem je NFκB, který je aktivovaný jak v místě zánětu, tak i v solidních tumorech. Již zmíněné TLR hrají klíčovou roli v interakci mezi NFκB a střevní mikroflórou. V patogenezi zánětu i v onkogenezi se uplatňují i další cytokiny (např. IL-6, IL-10 či IL-11), čímž se stávají dalším potenciálním cílem biologické léčby.^(39–41)

Screening neoplazií u IBD

Cílem screeningu je odhalování neoplazií v časných, potenciálně kurabilních stádiích. U IBD se vzhledem k onkogenezi a charakteru postižení uplatňuje pouze koloskopie. Doporučené postupy se shodují na nutnosti zahájení pravidelného endoskopického sledování 8-10 a 15-20 let od počátku manifestace u pankolitidy, resp. levostranné kolitidy.^(3, 42, 43) Výjimkou jsou pacienti s omezením zánětu na rektum, u kterých není screeningový program požadován, protože zvýšené riziko onkogeneze nevykazují. Studie Lutgense na 149 nemocných s KRK⁽⁴⁴⁾ poukazuje na limity obecně doporučovaného screeningového schématu: až u 22 % těchto nemocných se KRK vyvinul před zahájením screeningu. Podobně jako studie Karvellase⁽⁴⁵⁾ navíc uvádí, že rychlost rozvoje a biologická agresivita KRK je vyšší u pacientů, u nichž se idiopatický střevní zánět manifestoval po 40. roku věku nebo v prvních 15 letech od diagnózy choroby.⁽⁴⁶⁾ Délka intervalu mezi jednotlivými endoskopickými kontrolami je dána stratifikací podle čtyř rizikových faktorů – přítomnosti zánětu, rozsahu postižení, přítomnosti polypů a rodinné anamnézy pozitivní na KRK. Za vysoce rizikové faktory se pokládá PSC, setrvalé extenzivní kolitida s vysokou zánětlivou aktivitou, rodinná anamnéza s postižením příslušníka ve věku do 50 let a přítomnost stenózy nebo dysplazie zjištěná na jiném pracovišti. Zde se doporučují

kontrolní koloskopie v ročních intervalech. V ostatních případech se dostupné doporučené postupy poněkud liší. Podle posledního z nich z roku 2013 se u nemocných se středním rizikem, například u extenzivní kolitidy s variabilní zánětlivou aktivitou, doporučuje opakování koloskopie po dvou až třech letech a u ostatních po pěti letech. Doporučený postup z roku 2012 rozlišuje pouze dvě rizikové skupiny (Obr. 1 schéma). Roční interval vyšetření by měl být dodržován u pacientů s PSC-IBD, a to bez ohledu na lokalizaci a aktivitu onemocnění.⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾ Premalignity sporadického KRK, typicky adenomy, bývají oproti okolní tkáni dobře ohraničené a mají vysokou míru zachytu při rutinním koloskopickém vyšetření. Dysplazie u kolitidy naproti tomu bývá často obtížné odlišit od zánětlivých změn.⁽⁵⁰⁾ I proto se doporučuje provádět screeningové koloskopie v klidovém stadiu kolitidy (během remise). Naprosto nezbytná je dokonalá příprava, a pokud tomu tak není, je nutné vyšetření zopakovat.⁽⁵¹⁾ Zdácnlivě překvapivé je poměrně málo jednoznačných dokladů podporujících přínos screeningu – je tomu tak proto, že jeho hypotetický přínos je tak zřejmý, že kontrolované studie bez screeningu jsou neetické. Nicméně podle jedné z nich bylo pětileté přežití ve screenované skupině 100 %, zatímco ve skupině kontrolní 74 %.⁽⁵²⁻⁵⁵⁾ Retrospektivní studie na 40 nemocných s KRK v terénu kolitidy popsala statisticky signifikantně vysoký (66 %) zachyt časných stadií karcinomu (Dukes A) při dodržování



Obr. 1 Schéma diagnosticko-terapeutického algoritmu u dysplazií asociovaných s kolitidou

poea Zdeňku Mařatkovi

doporučeného harmonogramu koloskopických vyšetření.⁽⁵⁶⁾ Jednotlivé studie nelze univerzálně srovnávat, protože se liší selekcí nemocných a způsobem odběrů biotických vzorků. Léčebná strategie kolorektálních neoplazií u IBD se řídí podle endoskopické charakteristiky a/nebo histologické klasifikace. Oba přístupy shrnujeme ve dvou následujících samostatných kapitolách.

Endoskopicky viditelné léze

Současná literatura v klasifikaci neoplastických lézí u IBD není jednotná. Zavádějícím pojmem může být „flat lesion“ (plochá léze), který v některých publikacích označuje endoskopicky nedetekovatelnou dysplazii zachycenou v náhodné biopsii (viz další kapitola). V jiných zdrojích je plochou lézí myšlena endoskopicky viditelný útvar, odpovídající typu IIa podle Pařížské klasifikace.⁽⁵⁷⁾ Pro účely této publikace je plochou lézí myšlena výhradně druhá zmíněná varianta. Terminologie i doporučený postup, pokud jde o přístup k neoplaziím u IBD, prodělaly v posledních letech významné změny vzhledem k větší senzitivitě moderních endoskopických metod, umožňujících zobrazení lézí v minulosti nedetekovatelných.

LÉZE PODOBNÉ ADENOMU („ADENOMA-LIKE“)

Pod tímto pojmem, označovaným někdy jako „ALM“ (adenoma-like mass), jsou zahrnuty léze podobné sporadickým adenomovým polypům. Jsou dobře ohraničené proti okolí⁽⁵⁸⁾ a podle tvaru a velikosti se odstraňují polypektomií, endoskopickou mukózní resekcí (EMR) a endoskopickou submukózní disekcí (ESD). Po snesení ALM je vždy nutné biopskovat okolní tkáň ke zhodnocení aktivity zánětu a především k vyloučení dysplazií v okolní sliznici. Je-li v přilehlé tkáni detekována dysplazie jakéhokoli stupně, je pacient indikován k proktokolektomii. V opačném případě je nutné provést kontrolní vyšetření s biopsiemi s odstupem 3–6 měsíců. Pozitivní nález dysplazie v reziduální tkáni je opět indikací ke kolektomii, stejně jako mnohočetné ALM s HGD a jakýkoliv záchyt invazivního karcinomu. Léze detekované v oblasti s minimální

okolní zánětlivou aktivitou a absencí dysplazie lze považovat za běžné sporadické adenomy.⁽⁵⁹⁾

VIDITELNÉ LÉZE, KTERÉ NEJSOU PODOBNÉ ADENOMU (NON-ADENOMA-LIKE)

Tyto typy novotvarů, dříve označované termínem „dysplasia associated lesion or mass – DALM“, zahrnují škálu široce přisedlých útvarů, mukózních plaků, nepravidelných striktur, uzlovitých hrboleů a jiných neformálních slizničních mas nehodnotitelných jako ALM (Obr. 2) a s histologicky prokázanou dysplazií.^(60, 61) V praxi ovšem může být odlišení od předchozích struktur pro běžné přechodné tvary obtížné a také genetické vyšetření neprokázalo mezi oběma strukturami žádné rozdíly.⁽⁶²⁾ Zejména stenózy jsou spojeny s vysokým rizikem vzniku synchronního či metachronního adenokarcinomu, a jejich záchyt je proto sám o sobě indikací k profylaktické kolektomii.⁽⁶³⁾ U lézí zřetelně ohraničených je možné provést endoskopickou léčbu – o dalším postupu rozhoduje míra dysplazie, kompletnost odstranění a přítomnost či nepřítomnost v ostatním střevě. Při úplném odstranění dysplastické struktury a nepřítomnosti dalších rizikových faktorů je endoskopická léčba řešením definitivním, v ostatních případech je indikována kolektomie.

Nahodilý záchyt slizniční dysplazie – klasifikace a terapie

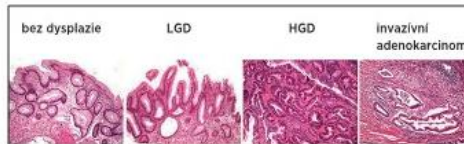
Dysplazie je definována jako neoplastický proces epitelu vymezený bazální membránou a nešířící se přes lamina propria (proto též synonymum „intraepiteliální neoplazie“).⁽⁶⁴⁾ Zatímco se sporadické karcinomy vyvíjejí sekvencí adenom-karcinom, u neoplazií při IBD terminologie zahrnuje následné pojmy negativní dysplazie – neprůkazná dysplazie – dysplazie nízkého stupně (low-grade) – dysplazie vysokého stupně (high-grade) – karcinom“ (Obr. 3).⁽⁵⁸⁾ Hranice mezi jednotlivými stadii nemusí být jednoznačná a určování daného typu patologie vykazuje značnou intra- i interindividuální variabilitu zejména v následných (nikoliv mezních) stadiích. Proto se doporučuje potvrzení diagnózy dysplazie či karcinomu minimálně dvěma patologi. Zatímco se sporadický karcinom zpravidla tvoří v 1–2 fókusech, neoplazie u IBD mívají multifokální charakter, což vyplývá z primárně plošného zánětlivého poškození, a z čehož také vyplývá omezená možnost kontroly a zvýšené riziko.^(65, 66)

NEGATIVNÍ DYSPLAZIE

U aktivního zánětu s ulceracemi, kryptitidou či kryptovými abscesy může docházet k reaktivním změnám sliznice do určité míry imitujícím dysplastické atypie, nicméně o dysplazii se nejedná. Screening probíhá v intervalech určených obecnou mírou rizika.⁽⁶⁷⁾



Obr. 2 Non-adenoma like léze lokalizovaná v colon caecum u pacienta s UC vyšetřené na KH IKEM pomocí chromoendoskopie (s metylenovou modří)



Obr. 3 Histologický obraz neoplazií asociovaných s ulcerózní kolitidou, barveno hematoxylin-eozinem (LGD: low-grade dysplazie, HGD: high-grade dysplazie)

NEPRŮKAZNÁ DYSPLAZIE

Za neprůkaznou dysplazii lze označit přechod mezi předchozím stavem a jednoznačnou intraepiteliální neoplazií. Představuje situaci, kdy patolog není schopen spolehlivě rozlišit regenerativní změny při aktivním zánětu od dysplastických atypií. Každou takto hodnocenou lézi by měl revidovat další specializovaný patolog. Při jejím potvrzení by měla být s odstupem 3–6 měsíců provedena kontrolní koloskopie s etážovými biopsiemi.⁽⁶⁸⁾

DYSPLAZIE NÍZKÉHO STUPNĚ (LOW-GRADE)

Pacientům s multifokálním záchytem LGD (dva a více fokusů během jednoho vyšetření) mimo endoskopicky ošetřitelné léze by měla být doporučena profylaktická kolektomie. Zvážení radikálního výkonu je však namístě i u unifokálního záchytu LGD. Pravděpodobnost pětileté progresy do HGD nebo KRK se totiž u uni- i multifokální LGD zdá být srovnatelná (16–54 % v obou případech). Problémem je totiž schopnost stávajícími metodami detekovat všechny léze. Pokud pacient kolektomií odmítá, měla by kontrolní koloskopie následovat po 3–6 měsících. Pokud se při kontrolním vyšetření dysplazie neprokáže, měl by být pacient i přesto setrvale sledován ve zkrácených intervalech.^(7, 69, 70)

DYSPLAZIE VYSOKÉHO STUPNĚ (HIGH-GRADE)

Nález HGD mimo viditelné a odstranitelné léze by měl vždy vést k indikaci proktokolektomie pro vysoké riziko koexistence nebo brzkého rozvoje invazivního karcinomu. V prospektivní studii se během dalšího sledování KRK vyvinul u 15 ze 47 pacientů s high-grade dysplazií. Podle jiných studií může být již v době záchytu HGD výskyt (synchronního) KRK 42–67 %.^(71–73)

Endoskopické metody v detekci neoplazií

Role endoskopie v diagnostice neoplazií u IBD zůstává nezástupitelná. Moderní metody v endoskopii dnes již umožňují většinu suspektních lézí diferencovat makroskopicky efektivně přímo během vyšetření doplněného o cílený odběr biopsií ze suspektních fokusů. Je nutno přiznat, že srovnávací studie předpoklady účinné detekce sofistikovanými barevně modulačními metodami často nenaplnují, což ovšem může být ovlivněno tím, že jsou srovnávány s nejnovější verzí standardní endoskopie s vysokou rozlišovací schopností.

KOLONOSKOPIE S ETÁŽOVOU BIOPSIÍ

Koloskopie s etážovým kvadrantovým odběrem nahodilých biopsií je dosavadním, avšak postupně opouštěným standardem,

a to zejména pro malou pravděpodobnost náhodného záchytu neoplazie a nízkou adhezenci endoskopistů v souvislosti s finanční a procedurální náročností. Technicky tato procedura spočívá v odběru čtyř biopsií v různých kvadrantech po každých 10 cm průběhu tlustého střeva, případně v pětacentimetrových intervalech v levostranném tračníku, kde je riziko malignity větší. Doplnějí se odběry ze suspektních lézí.^(3, 42, 43, 68, 74) Recentní studie ovšem prokázaly, že při biopsiích pouze z makroskopicky suspektních míst dosahuje záchyt dysplazií 73–77 %, u KRK dokonce 89–100 %, jinými slovy dysplazie v terénu makroskopicky nezměněné sliznice je málo pravděpodobná.^(61, 75) Rizikovými faktory přehlédnutí neoplazie bývají nedostatečná příprava, lokalizace v rektu, v oblasti flexur či za slizničními řasami.⁽⁷⁶⁾

PANCHROMOKOLOSKOPIE

Chromoendoskopie je metoda založená na vizualizaci trávicího traktu po aplikaci kontrastního barviva, zpravidla metylenové modři či indigokarmínu. Umožňuje podrobné vyhodnocení slizničního povrchu, a tedy klasifikaci neoplazie podle některého ze schémat, z nichž nejznámější je Kudova klasifikace.⁽⁷⁷⁾ Použití barviv s sebou pravděpodobně nenese větší rizika, i když v experimentu *in vitro* bylo popsáno poškození DNA metylenovou modří.⁽⁷⁸⁾ Nedávná metaanalýza zjistila o 7 % vyšší výťažnost chromoendoskopie ve srovnání se standardní koloskopií (white-light endoscopy – WLE).⁽⁷⁹⁾ Podle jiné metaanalýzy byla senzitivita chromoendoskopie v detekci intraepiteliálních neoplazií 83,3 % a specifita 91,3 %. Metoda je v porovnání s etážovými biopsiemi časově a technicky nenáročná, bezpečná a relativně levná. Většina doporučených postupů ji proto doporučuje jako metodu volby, nicméně k jejímu odpovídajícímu využití endoskopickou veřejností nedochází v důsledku rezervovaného přístupu endoskopistů, vyplývajícího patrně zejména ze skutečnosti, že chromoendoskopie nebývá hrazena zdravotními pojišťovnami (Tab. 1).

NBI – NARROW-BAND IMAGING

Narrow-band imaging (NBI, Olympus, částečně podobně jako technologie jiných výrobců – Fujinon intelligent color enhancement – FICE, Fujinon – a i-Scan – Pentax) využívá zvýraznění dysplazií selektivní iluminací světlem o vlnové délce odpovídající modrozelené části viditelného spektra. Podle několika studií metoda zásadně nepřevyšuje senzitivitu zobrazení pomocí (HD) WLE.^(80, 81) To potvrzuje např. i nedávná randomizovaná studie na 112 pacientech, u kterých bylo v obou skupinách identifikováno pět jedinců s alespoň jednou suspektní lézí, následně verifikovanou histologicky (OR 1,00; 95% CI, 0,27–3,67; p = 1,00).⁽⁶¹⁾

Tab. 1 Chromoendoskopie v detekci kolorektálních dysplazií

Autor	Rok	N	Barvivo	Výsledek	p
Kiesslich	2003	165	MB	poz. 32 vs. 10	0,00315
Jamamoto	2003	57	IC	senz. 86 vs. 38%	NS
Rutter	2004	100	IC	poz. 9 vs. 2	0,06
Hurstone	2005	81	IC	poz. 69 vs. 24	0,001
Kiesslich	2007	153	MB	poz. 19 vs. 4	0,05
Marion	2008	102	MB	poz. 17 vs. 3	0,001
Gunther	2011	150	IC	poz. 6 vs. 0	0,05

MB – metylenová modř, IC – indigokarmín

Tab. 2 Konfokální endomikroskopie v detekci kolorektálních dysplazií

Autor	Rok	N	Technika	Cíl	Výsledek	P
Dekker	2007	42	NBI/WL	dysplazie	susp. 52 vs. 28; poz. 9 vs. 12; fals. 43 vs. 16	0,026 0,672 0,015
Matsumoto	2007	46	NBI/WL	dysplazie	8 % vs. 0,4 %	0,03
Van den Broek	2008	50	AFI/WL NBI/AFI	dysplazie	miss 0 % vs. 50 %	0,36
Matsumoto	2010	48	AFI/WL	dysplazie	protuze 30 % vs. 3,3 %	0,0001
Pellise	2011	60	NBI/WL in- digokarmín	dysplazie	susp. 136 vs. 208; poz. 20 vs. 12; fals. 126 vs. 196	0,01 0,644 0,001
Van den Broek	2011	48	NBI/WL	dysplazie	poz. 13 vs. 11	0,727
Ingiatović	2012	112	NBI/WL	dysplazie	poz. 5 vs. 7; fals. 12 vs. 4	0,57 0,06
Efthymiou	2013	144	NBI/WL	dysplazie	susp. 102 vs. 131; poz. 20 vs. 23	0,001 0,18

Obdobně v prospektivní randomizované studii porovnávající NBI a chromoendoskopii nezachytila tato metoda 7 z 22 lézí u 6 ze 13 pacientů ($p = 0,2$), zatímco při použití chromoendoskopie se nepodařilo detekovat 3 z 22 následně verifikovaných lézí u 2 ze 13 pacientů ($p = 0,2$).⁽⁸²⁾ NBI tedy není doporučována jako metoda volby, nicméně ji lze akceptovat jako metodu doplňkovou. Ve vývoji jsou technologie NBI nové generace, kde klinická data zatím chybí.

KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE

Konfokální laserová endomikroskopie (CLE) je metoda umožňující evaluaci histologických změn *in vivo*, tedy přímo v průběhu endoskopického vyšetření. Prospektivní práce porovnávající metodu s chromoendoskopií na souboru 153 pacientů přisuzuje CLE vysokou senzitivitu (97,8 %), specifitu (98,3 %) a možnost přesného zacílení následné biopsie (97,8 %).⁽⁸³⁾ Slibné výsledky vykazují instrumenty kombinující více zobrazovacích technik, například CLE a imunofluorescenci s podáním značené anti-TNF- α protilátky. Tato metoda je potenciálně aplikovatelná nejen při detekci dysplazií, ale i k predikci terapeutické odpovědi na biologika.⁽⁸⁴⁾ Využití CLE v rutinní klinické praxi je výrazně limitováno vysokou cenou přístroje i vysokými požadavky na schopnost histologické interpretace. Metoda tedy dosud nepřekročila hranice experimentu (Tab. 2).⁽⁸⁵⁾

AUTOFLUORESCENCE (AUTOFLUORESCENCE IMAGING – AFI)

Autofluorescenční zobrazení využívá excitace tkáňových fluoroforů světlem o krátkých vlnových délkách. Tento jev vede k emisi dlouhovlnného fluorescenčního světla bez nutnosti podávání exogenních činidel (na rozdíl od chromoendoskopie), čímž dochází k barevnému zvýraznění dysplastické slizniční tkáně. V prospektivní randomizované studii na 50 pacientech vedené van den Broekem prokázalo AFI 6 lézí u 25 pacientů, u kterých WLE odhalila pouze tři z nich. Naopak u skupiny

25 pacientů vyšetřených nejprve AFI s detekcí 10 lézí neprokázala WLE žádné další dysplastické změny ($p = 0,036$).⁽⁸⁶⁾

Sledování nemocných po kolektomii

Neoplazie pouche jsou relativně vzácné. Kariv et al.⁽⁸⁷⁾ je zaznamenali u 39 (1,2 %) z 3203 operovaných, přičemž u 23 se jednalo o dysplazie. Každoroční sigmoidoskopie se doporučuje u nemocných se zvýšeným rizikem, což zahrnuje dysplazii KRK před kolektomií, PSC a permanentní zánět pouche. Doporučuje se odebrat po čtyřech vzorcích z ilea, anastomózy a sliznice pod anastomózou.

Endoskopická léčba dysplazií

Rozvoj zobrazovacích modalit i technik endoskopické polypektomie a disekce vyústil ve skutečnost, že většina lézí dříve indikovaných ke kolektomii může být odstraněna endoskopicky. Ve všech případech je nutné individuálně zvážit riziko kolektomie na straně jedné, a naopak úplnost odstranění léze a schopnost účinně kontrolovat a včas zachytit případnou neoplastickou transformaci ve zbývajícím střevě na straně druhé. Techniky endoskopického odstranění se zásadně neliší od jiných indikací a v kontextu tohoto článku je dále není třeba podrobně popisovat. Rekurence jsou podobné jako u adenomů běžné v závislosti na délce sledování, nicméně při adekvátním sledování endoskopicky detekovatelné.^(88, 89, 90)

Chirurgická léčba

Mimo indikací profylaktické kolektomie uvedených v předešlém textu je chirurgická léčba indikována i v následujících situacích. První z nich jsou endoskopicky neřešitelné léze. To se týká i útvarů, u kterých je technicky neúspěšný lifting podmiňující endoskopické odstranění. Může být způsoben fibrózou tkáně, ale i invazí karcinomu. Dalším případem je

pozitivní detekce dysplazie v terénu mnohočetných polypů, kdy jsou jejich kompletní odstranění a podrobné histologické vyšetření nereálná. Za určitých okolností lze profylaktickou kolektomií zvažovat u pacientů s výhledově dlouhodobým vysokým rizikem KRK, jako jsou např. mladí nemocní s PSC zatížení dalšími významnými rizikovými faktory (rozsah a aktivita kolitidy, rodinná anamnéza, zvažovaná transplantace jater aj.). Pacienti po subtotální kolektomii s ileorektální anastomózou nebo po jiných výkonech zanechávajících reziduum rekta jsou ohroženi vznikem neoplazií v úsecích distálně od anastomózy nebo v ileoanálním pouchu. Důsledné předoperační posouzení stavu rekta je proto naprosto nutností. Nezbytná je také pravidelná monitorace po výkonu dle obdobných principů jako u ostatních pacientů s IBD.^(91, 92) Obecně u všech nemocných platí, že je s nimi třeba invazivní léčbu podrobně konzultovat. Ve sporných případech není při dobré kondici pacienta příklon ke kolektomii chybou.

Farmakoterapie a rozvoj neoplazií

AMINOSALICYLÁTY

Mesalazin a sulfasalazin jsou základními léčivy u všech typů IBD, především pak při udržovací terapii. Jedná se o relativně levná farmaka s minimem nežádoucích účinků, s možností perorální či topické administrace. Jejich protektivní účinek v souvislosti se vznikem kolorektálních neoplazií byl předmětem četných studií, z nichž většina pozitivní efekt, zejména pak u mesalazinu, potvrdila. Tyto závěry byly navíc podpořeny několika studiemi na animálních modelech. Působení aminosalicylátů pravděpodobně nejvýznamněji interferuje s patogenetickou dráhou zprostředkovanou NFκB buňkami, ovlivňuje však i mnohé další (inhibice volných radikálů, modifikace TNF-α/TNF-β a WNT/β-kenin signalizace, složení mikrobioty aj.). Míra chemoprotektivního efektu pravděpodobně závisí na dávce, provedené studie stanovily hraniční snížení rizika na úrovni dávky 1 g účinné látky denně.⁽⁹³⁻⁹⁵⁾

KORTIKOIDY A OSTATNÍ IMUNOSUPRESIVA

Systémové kortikosteroidy se v terapii IBD užívají především k léčbě akutních stavů, a proto úvahy o chemoprevenci nádorů při dlouhodobém podávání jsou irelevantní. I u budesonidu, který má jen minimální systémové účinky a lze jej podávat dlouhodobě, příslušná data chybějí.⁽⁹⁶⁾ U azathioprinu a 6-merkaptopurinu přesvědčivé důkazy ve smyslu chemoprevence chybí (metanalýza Jess et al., RR neoplazie 0,72, RR KRK 0,90),⁽⁹⁷⁾ na druhé straně zvyšují riziko lymfomu.⁽⁹⁸⁾

BIOLOGICKÁ LÉČBA

Potenciální účinek biologik v prevenci novotvarů u IBD spočívá v efektivní kontrole zánětu. Studie na myších modelech léčených anti-TNFα terapií tuto hypotézu připouštějí,⁽⁹⁹⁾ ale u lidských pacientů solidní data chybí. Nedávná retrospektivní studie však poukázala na mírné snížení výskytu KRK u pacientů léčených infliximabem (4 z 651) v porovnání s epidemiologickou predikcí.⁽¹⁰⁰⁾

URSODEOXYCHOLOVÁ KYSELINA

Ursodeoxycholová kyselina (UDCA) je nejčastěji používaným farmakem u pacientů s PSC. K chemoprotektivnímu účinku UDCA se dnes přiklání většina zdrojů, nicméně jednoznačně doložen doposud nebyl. Dle metanalýzy z roku 2013 zabraňuje UDCA progresi HGD a KRK, u LCD pak podobná data chybějí.

V klinické praxi je třeba se vyvarovat příliš vysokého dávkování UDCA. Dávky 28 mg/kg/den a více mohou nejen eskalovat jaterní dysfunkci, ale patrně i zvyšují riziko vzniku KRK.^(101, 102) Za optimální dávku se považuje 8–15 mg/kg.^(103, 104)

VITAMÍN D

Podle recentní studie zvýšila deficiencie vitamínu D v koncentraci < 20 ng/l významně riziko KRK (n = 2809, RR 1,82).⁽¹⁰⁵⁾

OSTATNÍ LÉČIVA

Ojediněle byly popsány příznivé účinky dalších substancí, jako například jiných vitamínů, kalcia, statinů nebo kyseliny listové, přesvědčivé důkazy však chybějí.⁽⁴⁷⁾

Závěr

Kolorektální neoplazie komplikující idiopatické střevní záněty představují pro svá patogenetická a klinická specifika významnou problematiku. Riziko malignizace se uplatněním účinné léčby i screeningu snižuje a při dodržování známých pravidel může být v dnešní době minimální.

Prohlášení: autoři v souvislosti s tématem práce nepolupracovali v posledních 12 měsících s žádnou farmaceutickou firmou.

Literatura

1. CROHN, B., ROSENBERG, H. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci*, 1925, 170, p. 220–228.
2. XIE, J., ITZKOWITZ, SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *Wor J Gastroenterol*, 2008, 14, p. 378–389.
3. ITZKOWITZ, SH., HARPAZ, N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2004, 126, p. 1634–1648.
4. EKBORN, A., HELMICK, C., ZACK, M., et al. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*, 1990, 323, p. 1228–1235.
5. SÖDERLUND, S., BRANDT, L., LAPIDUS, A., et al. Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2009, 136, p. 1561–1567.
6. WINTHER, KV., JESS, T., LANGHOLZ, E., et al. Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004, 2, p. 1088–1095.
7. RUTTER, MD., SAUNDERS, BP., WILKINSON, KH., et al. Thirty year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *YGast*, 2006, 130, p. 1030–1038.
8. BERNSTEIN, CN., BLANCHARD, JF., KLIEWER, E., et al. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 2001, 91, p. 854–862.
9. KOOBATIAN, GJ., CHOI, PM. Safety of surveillance colonoscopy in long-standing ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 1994, 898, p. 1472–1475.
10. RUTTER, M., SAUNDERS, B., WILKINSON, K., et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2004, 126, p. 451–459.
11. GUPTA, RB., HARPAZ, N., ITZKOWITZ, S., et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*, 2007, 133, p. 1099–1105.
12. LUKAS, M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis*, 2010, 28, p. 619–624.
13. MATHY, C., SCHNEIDER, K., CHEN, YY., et al. Gross versus microscopic pancolitis and the occurrence of neoplasia in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2003, 9, p. 351–355.
14. LEE, YM., KAPLAN, MM. Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med*, 1995, 332, p. 924–933.
15. DRASTICH, P., BAJER, L., WOHL, P., et al. Transplantace jater pro primární sklerozující cholangitidu. *Gastroent Hepatol*, 2013, 67, s. 413–420.
16. JESS, T., RUNGOE, C., PEYRIN-BIROULET, L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10, p. 639–645.
17. BROOME, U., LOFBERG, R., VERESS, B., et al. Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: evidence for increased neoplastic potential. *Hepatology*, 1995, 22, p. 1404–1408.

pocita Zdeňku Mařatkovi

18. VELAYOS, FS., LOFTUS, EV., JESS, T., et al. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: a case-control study. *YGAST*, 2006, 130, p. 1941-1949.
19. LASHNER, BA., TURNER, BC., BOSTWICK, DG., et al. Dysplasia and cancer complicating strictures in ulcerative colitis. *Dis Dis Sci*, 1990, 35, p. 349-352.
20. ASKLING, J., DICKMAN, PW., KARLEN, P., et al. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2001, 120, p. 1356-1362.
21. ITZKOWITZ, SH. Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006, 35, p. 553-571.
22. BRENTNALL, TA., CRISPIN, DA., RABINOVITCH, PS., et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1994, 107, p. 369-378.
23. WOHL, P., HUCL, T., DRASTICH, P., et al. Epithelial Markers of colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol*, 2013, 19, p. 2234-2241.
24. GONDEK, LP., TIU, R., O'KEEFE, CL., et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*, 2008, 111, p. 1534-1542.
25. FOGT, F., VORTMEYER, AO., GOLDMAN, H., et al. Comparison of genetic alterations in colonic adenomas and ulcerative colitis associated dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol*, 1998, 29, p. 131-136.
26. KERN, SE., REDSTON, M., SEYMOUR, AB., et al. Molecular genetic profiles of colitis-associated neoplasms. *YGAST*, 1994, 107, p. 420-428.
27. ISSA, JP., AHUJA, N., TOYOYTA, M., et al. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res*, 2001, 61, p. 3573-3577.
28. VENTHAM, NT., KENNEDY, N., NIMMO, ER., et al. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*, 2013, 145, p. 293-308.
29. ITZKOWITZ, SH., YIO, X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287, G7-17.
30. ERDMAN, SE., POUTAHIDIS, T., TOMCZAK, M., et al. CD4 CD25 regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice. *Am J Pathol*, 2003, 162, p. 691-702.
31. ERDMAN, SE., POUTAHIDIS, T. Roles for inflammation and regulatory T cells in colon cancer. *Toxicologic Pathol*, 2010, 38, p. 76-87.
32. WU, S., RHEE, KJ., ALBESIANO, E., et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*, 2009, 15, p. 1016-1023.
33. KIM, SW., KIM, HM., YANG, KM., et al. *Bifidobacterium lactis* inhibits NF- κ B in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16, p. 1514-1525.
34. FUKATA, M., CHEN, A., VAMADEVAN, AS., et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*, 2007, 133, p. 1869-1881.
35. GOODMAN, JE., HOFSETH, LJ., HUSSAIN, SP., HARRIS, CC., et al. Nitric oxide and p53 in cancer-prone chronic inflammation and oxyradical overload disease. *Environ Mol Mutagen*, 2004, 44, p. 3-9.
36. FERGUSON, LR. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res*, 2010, 690, p. 3-11.
37. BONNER, WM., REDON, CE., DICKEY, JS., et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8, p. 957-967.
38. RUTGEERTS, P., SANDBORN, WJ., FEAGAN, BG., et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 2005, 353, p. 2462-2476.
39. KUHN, R., LOHLER, J., RENNICK, D., et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 1993, 75, p. 263-274.
40. GRIVENNIKOV, S., KARIN, E., TERZIC, J., et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 2009, 15, p. 103-113.
41. AMIT, S., BEN-NERIAH, Y. NF- κ B activation in cancer: a challenge for ubiquitination- and proteasome-based therapeutic approach. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13, p. 15-28.
42. JESS, T., GAMBORG, M., MATZEN, P., et al. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100, p. 2724-2729.
43. RUBIN, DT., KAVITT, RT. Surveillance for cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am*, 2006, 35, p. 581-604.
44. LUTGENS, MW., VLEGGAAR, FP., SCHIPPER, ME., et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2008, 57, p. 1246-1251.
45. KARVELLAS, CJ., FEDORAK, RN., HANSON, J., et al. Increased risk of colorectal cancer in ulcerative colitis patients diagnosed after 40 years of age. *Can J Gastroenterol*, 2007, 21, p. 443-446.
46. BASSERI, RJ., BASSERI, B., IPPOLITI, A., et al. The efficacy of colorectal cancer surveillance in Crohn's colitis. *Gastroenterology*, 2010, 5(Suppl.), 5443.
47. VAN ASSCHE, G., DIGNASS, A., BOKEMEYER, B., et al. Second European evidence based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis, part 3: special situations. *J Crohns Colitis*, 2013, 7, p. 1-33.
48. LOFTUS, EV., HAREWOOD, GC., LOFTUS, CG., et al. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut*, 2005, 54, p. 91-96.
49. ANNESE, V., DAPERNO, M., RUTTER, MD., et al. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns and Colitis*, 2013, 7, p. 982-1018.
50. SADA, M., IGARASHI, M., YOSHIZAWA, S., et al. Dye spraying and magnifying endoscopy for dysplasia and cancer surveillance in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum*, 2004, 47, p. 1816-1823.
51. BARCLAY, RL., VICARI, JJ., DOUGHTY, AS., et al. Colonoscopic withdrawal times and adenoma detection during screening colonoscopy. *N Engl J Med*, 2006, 355, p. 2533-2541.
52. ROSENSTOCK, E., FARMER, RG., PETRAS, R., et al. Surveillance for colonic carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1985, 89, p. 1342-1346.
53. JONSSON, B., AHSNGREN, L., ANDERSSON, LO., et al. Colorectal cancer surveillance in patients with ulcerative colitis. *Br J Surg*, 1994, 81, p. 689-691.
54. LOFBERG, R., BROSTROM, O., KARLEN, P., et al. Colonoscopic surveillance in long-standing total ulcerative colitis - a 15years follow-up study. *Gastroenterology*, 1990, 99, p. 1021-1031.
55. LUTGENS, MW., OLDENBURG, B., SIERSEMA, PD., et al. Colonoscopic surveillance improves survival after colorectal cancer diagnosis in inflammatory bowel disease. *Br J Cancer*, 2009, 101, p. 1671-1675.
56. GIARDIELLO, FMGA., BAYLEWSS, TM., GOODMAN, SN., et al. Colorectal cancer in ulcerative colitis: survival in patients with and without colorectal cancer symptoms. *Inflamm Bowel Dis*, 1996, 2, p. 6-10.
57. LAMBERT, R. Endoscopic classification review, review EC. Update on the Paris classification of superficial neoplastic lesions in the digestive tract. *Endoscopy*, 2005, 37, p. 570-578.
58. FARRAYE, FA., ODZE, RD., EADEN, J., et al. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2010, 138, p. 746-774.
59. RUBIN, PH., FRIEDMAN, S., HARPAZ, N., et al. Colonoscopic polypectomy in chronic colitis: conservative management after endoscopic resection of dysplastic polyps. *Gastroenterology*, 1999, 117, p. 1295-300.
60. LENNARD-JONES, JE., MELVILLE, DM., MORSON, BC., et al. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut*, 1990, 31, p. 800-806.
61. RUTTER, MD., SAUNDERS, BP., WILKINSON, KH., KAMM, MA., et al. Most dysplasia in ulcerative colitis is visible at colonoscopy. *Gastrointest Endosc*, 2004, 60, p. 334-339.
62. ODZE, RD., BROWN, CA., HARTMANN, CJ., et al. Genetic alterations in chronic ulcerative colitis-associated adenoma-like DALMs are similar to non-colitic sporadic adenomas. *Am J Surg Pathol*, 2000, 24, p. 1209-1216.
63. ODZE, RD. Adenomas and adenoma-like DALMs in chronic ulcerative colitis: a clinical, pathological, and molecular review. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94, p. 1746-1750.
64. RIDDELL, RH., GOLDMAN, H., RANSOHOFF, DF., et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol*, 1983, 14, p. 931-968.
65. RUBIN, CE., HAGGITT, RC., BURMER, GC., et al. DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1992, 103, p. 1611-1620.
66. ALLENDE, D., ELMESSIRY, M. Inter- and intra-observer variability in the diagnosis of dysplasia in patients with inflammatory bowel disease: correlation of pathologic and endoscopic findings. *Colorectal Dis*, 2014, 16, p. 710-718.
67. ODZE, RD. Pathology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clin N Am*, 2006, 35, p. 533-552.
68. ITZKOWITZ, SH., PRESENT, DH., ODZE, RD., et al. Crohn's and Colitis Foundation of America Colon Cancer in IBD Study Group. Consensus conference: colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bow Dis*, 2005, 11, p. 314-321.
69. ULLMAN, T., CROOG, V., HARPAZ, N., et al. Progression of flat low-grade dysplasia to advanced neoplasia in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2003, 125, p. 1311-1319.
70. ULLMAN, T., ODZE, R., FARRAYE, FA. Diagnosis and management of dysplasia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Inflamm Bow Dis*, 2009, 15, p. 630-638.
71. HATA, K., WATANABE, T., KAZAMA, S., et al. Earlier surveillance colonoscopy programme improves survival in patients with ulcerative colitis associated colorectal cancer: results of a 23-year surveillance programme in the Japanese population. *Br J Cancer*, 2003, 89, p. 1232-1236.
72. CONNELL, WR., LENNARD-JONES, JE., WILLIAMS, CB., et al. Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1994, 107, p. 934-944.
73. BERNSTEIN, CN., SHANAHAN, F., WEINSTEIN, WM. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet*, 1994, 343, p. 71-74.

74. WOOLRICH, A.J., DaSILVA, M.D., KORELITZ, B.I. Surveillance in the routine management of ulcerative colitis: the predictive value of low-grade dysplasia. *Gastroenterology*, 1992, 103, p. 431–438.
75. RUBIN, D.T., ROTHE, J.A., HETZEL, J.T., et al. Are dysplasia and colorectal cancer endoscopically visible in patients with ulcerative colitis? *Gast Endoscop*, 2007, 65, p. 998–1004.
76. LEAPER, M., JOHNSTON, M.J., BARCLAY, M., et al. Reasons for failure to diagnose colorectal carcinoma at colonoscopy. *Endoscopy*, 2004, 36, p. 499–503.
77. KUDO, S., HIROTA, S., NAKAJIMA, T., et al. Colorectal tumours and pit pattern. *J Clin Pathol*, 1994, 47, p. 880–885.
78. DAVIES, J., BURKE, D., OLLIVER, J.R., et al. Methylene blue but not indigo carmine causes DNA damage to colonocytes in vitro and in vivo at concentrations used in clinical chromoendoscopy. *Gut*, 2007, 56, p. 155–156.
79. SUBRAMANIAN, V., MANNATH, J., RAGUNATH, K., et al. Meta-analysis: the diagnostic yield of chromoendoscopy for detecting dysplasia in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2011, 33, p. 304–312.
80. Van den BROEK, F., FOCKENS, P., van EEDEN, S., et al. Narrow-band imaging versus high-definition endoscopy for the diagnosis of neoplasia in ulcerative colitis. *Endoscopy*, 2011, 43, p. 108–115.
81. IGNJATOVIC, A., EAST, J.E., SUBRAMANIAN, V., et al. Narrow band imaging for detection of dysplasia in colitis: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107, p. 885–890.
82. PELLISÉ, M., LÓPEZ-CERÓN, M., RODRÍGUEZ DE MIGUEL, C., et al. Narrow-band imaging as an alternative to chromoendoscopy for the detection of dysplasia in long-standing inflammatory bowel disease: a prospective, randomized, crossover study. *Gastrointest Endosc*, 2011, 74, p. 840–848.
83. KIESSLICH, R., GOETZ, M., LAMMERSDORF, K., et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2007, 132, p. 874–882.
84. ATREYA, R., NEUMANN, H., NEUFERT, C., et al. In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nat Med*, 2014, 20, p. 313–318.
85. MOUSSATA, D., GOETZ, M., GLOECKNER, A., et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut*, 2011, 60, p. 26–33.
86. BROEK van den, F., FOCKENS, P., EEDEN van, S., et al. Endoscopic tri-modal imaging for surveillance in ulcerative colitis: randomised comparison of high-resolution endoscopy and autofluorescence imaging for neoplasia detection; and evaluation of narrow-band imaging for classification of lesions. *Gut*, 2008, 57, p. 1083–1089.
87. KARIV, R., REMZI, F.H., LIAN, L., et al. Preoperative colorectal neoplasia increases risk of pouch neoplasia in patients with restorative proctocolectomy. *Gastroenterology*, 2010, 139, p. 806–812.
88. HURLSTONE, D.P., SANDERS, D.S., ATKINSON, R., et al. Endoscopic mucosal resection for flat neoplasia in chronic ulcerative colitis: can we change the endoscopic management paradigm? *Gut*, 2007, 56, p. 838–846.
89. QUINN, A.M., FARRAYE, F.A., NAINI, B.V., et al. Polypectomy is adequate treatment for adenoma-like dysplastic lesions (DALMs) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19, p. 1186–1193.
90. EAST, J.E., TOYONAGA, T., SUZUKI, N. Endoscopic management of nonpolypoid colorectal lesions in colonic IBD. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2014, 24, p. 435–445.
91. RUTTER, M.D., RIDDEL, R.H. Colorectal Dysplasia in inflammatory bowel disease: a clinicopathologic perspective. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12, p. 359–367.
92. SCARPA, M., van KOPEREN, P.J., UBBINK, D.T., et al. Systematic review of dysplasia after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *Br J Surg*, 2007, 94, p. 534–545.
93. BERNSTEIN, C.N., EADEN, J., STEINHART, A.H., et al. Cancer prevention in inflammatory bowel disease and the chemoprophylactic potential of 5-aminosalicylic acid. *Inflamm Bowel Dis*, 2002, 8, p. 356–361.
94. HERFARTH, H. The role of chemoprevention of colorectal cancer with 5-aminosalicylates in ulcerative colitis. *Dig Dis*, 2012, 30, p. 55–59.
95. MacGREGOR, D.J., KIM, Y.S., SLEISSENGER, M.H., JOHNSON, L.K. Chemoprevention of colon cancer carcinogenesis by balsalazide: inhibition of azoxymethane-induced aberrant crypt formation in the rat colon and intestinal tumor formation in the B6-Min/+ mouse. *Int J Oncol*, 2002, 17, p. 173–179.
96. CHAN, E.P., LICHTENSTEIN, G.R. Chemoprevention: risk reduction with medical therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin*, 2006, 35, p. 675–712.
97. JESS, T., LOPEZ, A., ANDERSSON, M., et al. Thiopurines and risk of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12, p. 1793–1800.
98. ACTIS, G.C., PELLICANO, R., DAVID, E., SAPINO, A. Azathioprine, mucosal healing in ulcerative colitis, and the chemoprevention of colitic cancer: a clinical-practice-based forecast. *Inflamm Al Dr Tar*, 2010, 9, p. 6–9.
99. KIM, Y.J., HONG, K.S., CHUNG, J.W., et al. Prevention of colitis-associated carcinogenesis with infliximab. *Cancer Prev Res*, 2010, 3, p. 1314–1333.
100. CASPERSEN, S., ELKJAER, M., RIIS, L., et al. Infliximab for inflammatory bowel disease in Denmark 1999–2005: clinical outcome and follow-up evaluation of malignancy and mortality. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008, 6, p. 1212–1217.
101. EATON, J.E., SILVEIRA, M.G., PARDI, D.S., et al. High-dose ursodeoxycholic acid is associated with the development of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106, p. 1638–1645.
102. LINDOR, K.D., KNOWDLEY, K.V., LUKETIC, V.A., et al. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*, 2009, 50, p. 808–814.
103. TUNG, B.Y., EMOND, M.J., HAGGITT, R.C., et al. Ursodiol use is associated with lower prevalence of colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Ann Intern Med*, 2001, 134, p. 89–95.
104. PARDI, D.S., LOFTUS, E.V., KREMENS, W.K., et al. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 2003, 124, p. 889–893.
105. ANANTHAKRISHNAN, A.N., CHENG, S.C., CAI, T., et al. Association between reduced plasma 25-hydroxy vitamin D and increased risk of cancer in patients with inflammatory bowel diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12, p. 821–827.

e-mail: jusp@medicon.cz

PUBLIKACE 8



Retrospective Cohort Study

Simultaneous occurrence of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer in patients resected for focal pancreatic mass

Peter Macinga, Adela Pulkertova, Lukas Bajer, Jana Maluskova, Martin Oliverius, Martin Smejkal, Maria Heczkova, Julius Spicak, Tomas Hucl

Peter Macinga, Adela Pulkertova, Lukas Bajer, Julius Spicak, Tomas Hucl, Department of Gastroenterology and Hepatology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Jana Maluskova, Department of Pathology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Martin Oliverius, Department of Transplant Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Martin Smejkal, Department of Radiodiagnostics and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Maria Heczkova, Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Author contributions: Hucl T designed the research; Macinga P, Pulkertova A, Bajer L and Heczkova M performed the research; Macinga P and Hucl T analysed the data; Maluskova J and Smejkal M provided clinical advice and contributed to the analysis; Macinga P and Hucl T wrote the paper; Oliverius M and Spicak J supervised the research and revised the report.

Institutional review board statement: This study was reviewed and approved by the Ethics Committee with multi-center competence of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM) and Thomayer Hospital (TN).

Informed consent statement: Patients were not required to give informed consent to the study because the analysis used anonymous clinical data that were obtained after each patient agreed to treatment by written consent.

Conflict-of-interest statement: We have no financial relationship to disclose.

Data sharing statement: No additional data are available.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Correspondence to: Tomas Hucl, MD, PhD, Associate Professor, Department of Gastroenterology and Hepatology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 9, Prague 140 21, Czech Republic. tomas.hucl@ikem.cz
Telephone: +420-2-61362600
Fax: +420-2-61362615

Received: December 28, 2016

Peer-review started: December 29, 2016

First decision: January 10, 2017

Revised: January 31, 2017

Accepted: March 2, 2017

Article in press: March 2, 2017

Published online: March 28, 2017

Abstract

AIM

To assess the occurrence of autoimmune pancreatitis (AIP) in pancreatic resections performed for focal pancreatic enlargement.

METHODS

We performed a retrospective analysis of medical records of all patients who underwent pancreatic resection for a focal pancreatic enlargement at our

tertiary center from January 2000 to July 2013. The indication for surgery was suspicion of a tumor based on clinical presentation, imaging findings and laboratory evaluations. The diagnosis of AIP was based on histology findings. An experienced pathologist specialized in pancreatic disease reviewed all the cases and confirmed the diagnosis in pancreatic resection specimens suggestive of AIP. The histological diagnosis of AIP was set according to the international consensus diagnostic criteria.

RESULTS

Two hundred ninety-five pancreatic resections were performed in 201 men and 94 women. AIP was diagnosed in 15 patients (5.1%, 12 men and 3 women) based on histology of the resected specimen. Six of them had AIP type 1, nine were diagnosed with AIP type 2. Pancreatic adenocarcinoma (PC) was also present in six patients with AIP (40%), all six were men. Patients with AIP + PC were significantly older (60.5 *vs* 49 years of age, $P = 0.045$), more likely to have been recently diagnosed with diabetes (67% *vs* 11%, $P = 0.09$), and had experienced greater weight loss (15.5 kg *vs* 8.5 kg, $P = 0.03$) than AIP patients without PC. AIP was not diagnosed in any patients prior to surgery; however, the diagnostic algorithm was not fully completed in every case.

CONCLUSION

The possible co-occurrence of PC and AIP suggests that preoperative diagnosis of AIP does not rule out simultaneous presence of PC.

Key words: Chronic pancreatitis; Pancreatic cancer; IgG4-related disease; Autoimmune pancreatitis; Malignancy

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: In this retrospective study we confirmed that a considerable proportion of patients undergoing pancreatic resection for tumor suspicion have autoimmune pancreatitis. Furthermore, we show here the largest ever published group of patients with pancreatic cancer and autoimmune pancreatitis co-occurrence. The possible synchronous occurrence of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer implies major clinical consequences as the preoperative diagnosis of autoimmune pancreatitis might not rule out pancreatic cancer. Patients with autoimmune pancreatitis and patients with autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer differed in age at presentation, presence of diabetes and the extent of weight loss.

Macinga P, Pulkertova A, Bajer L, Maluskova J, Oliverius M, Smejkal M, Heczkova M, Spicak J, Huel T. Simultaneous occurrence of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer in patients resected for focal pancreatic mass. *World J Gastroenterol* 2017; 23(12): 2185-2193. Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i12/2185.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i12.2185>

INTRODUCTION

Autoimmune pancreatitis (AIP) is a rare clinical entity with an estimated prevalence of 0.82-2.2/100000 inhabitants in Japan^[1,2]. The prevalence of this disease in Western countries remains to be determined. AIP is diagnosed in only about 6% of patients with idiopathic chronic pancreatitis^[3]. Within this group, AIP is defined by specific clinical, laboratory, radiological, and histological findings^[4]. Currently, two subtypes of AIP are recognized. Type 1, also known as lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis, is considered a pancreatic manifestation of IgG4-related sclerosing disease. Type 2, idiopathic duct-centric pancreatitis, is often associated with inflammatory bowel disease. Type 1 disease is characterized by sclerosing storiform fibrosis with a lymphoplasmatic infiltrate rich in IgG4-positive plasma cells, and elevated serum IgG4 levels^[5]. Type 2 disease is characterized by disruption of the duct wall due to invasion by neutrophilic granulocytes, *i.e.*, granulocytic epithelial lesions, absence of IgG4-positive plasma cells, and no serum elevation of IgG4. These characteristic changes may result in diffuse swelling or focal enlargement of the organ. Patients with AIP often present with jaundice, abdominal pain and focal pancreatic enlargement. The lack of specific symptoms makes the diagnosis of AIP difficult.

Diagnostic algorithms from Japan, South Korea and United States were proposed in 2006^[6-8]. The international consensus diagnostic criteria (ICDC) published in 2011, unify the previous diagnostic strategies while respecting regional differences in clinical practice^[9]. The ICDC are based on evaluation of the pancreatic parenchyma by imaging (CT, MRI), the structure of the pancreatic duct, histology, serology, involvement of other organs, and response to corticosteroid therapy. A typical, although not the most common, imaging finding is diffuse enlargement of the pancreas. This may be accompanied by delayed enhancement (sausage-like pancreas or rim-like enhancement); however, often only segmental or focal enlargement of the pancreas is seen, especially in AIP type 2^[9,10]. Consequently, differentiating pancreatic cancer (PC) from AIP can be difficult and requires demonstration of a combination of clinical, serological, morphological and histological features. Despite the availability of well-defined diagnostic criteria, 6%-8% of patients with a pancreatic mass undergo unnecessary resection prior to a finding of autoimmune pancreatitis^[11].

The aim of our study was to determine the proportion of patients at our center with AIP among those who had a pancreatic resection for a pancreatic mass and to define the clinical characteristics of this

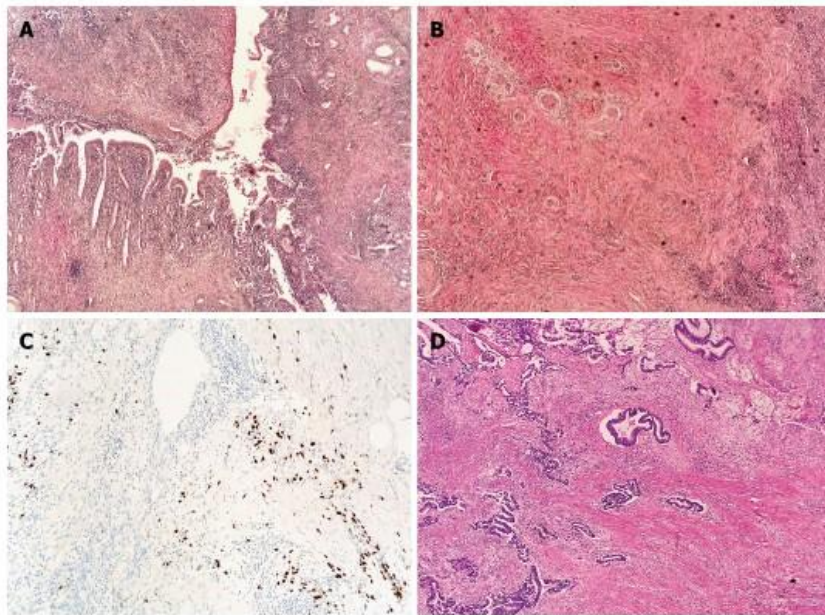


Figure 1 Histological findings in resected pancreatic tissue in a patient with synchronous presence of type 1 autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. A: Autoimmune pancreatitis (AIP), hematoxylin-eosin (HE) staining, original magnification $\times 40$; B: AIP showing storiform fibrosis, HE staining, original magnification $\times 40$; C: AIP with immunohistochemical staining of plasma cells for IgG4; D: Pancreatic cancer, HE staining, original magnification $\times 40$.

subgroup.

MATERIALS AND METHODS

We retrospectively analyzed medical records of all patients who underwent pancreatic resection for a focal pancreatic enlargement at the Institute for Clinical and Experimental Medicine from January 2000 to July 2013. The indication for surgery was suspicion of a tumor based on clinical presentation, imaging findings and laboratory evaluations. Many patients were referred to our tertiary center for pancreatic surgery with a diagnostic workout already done in the referring hospital and with an established diagnosis of suspected pancreatic cancer.

The diagnosis of AIP was based on histology findings. An experienced pathologist (J.M.) specialized in pancreatic diseases (hundreds of PC and chronic pancreatitis cases reported) reviewed all the cases and confirmed the diagnosis in pancreatic resection specimens suggestive of AIP. The histological diagnosis of AIP was based on the ICDC criteria. In AIP type 1, the presence of storiform fibrosis, obliterative phlebitis, and abundant IgG4-positive plasma cells was required, granulocytic epithelial lesions were indicative of AIP type 2^[4].

The Mann-Whitney *U* test was used for statistical analysis of quantitative data and the Fisher's exact test was used for qualitative data. A *P*-value of 0.05 was required for statistical significance. Data were analyzed

by the center statistician using JMP 10 software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

The study was performed according to Declaration of Helsinki including the changes accepted in Seoul, South Korea, during the 59th WMA General Assembly.

RESULTS

During the study period, we performed a total of 295 pancreatic resections in 201 men (68%) and 94 women (32%) with a median age of 61 (36-78) years. Pathological examination of the resected specimens revealed AIP in 15 patients (5.1%); 12 men and 3 women with a median age of 57 (35-67) years. A diagnosis of AIP was considered, but not confirmed, in two of these patients prior to pancreatectomy. In 13 of those patients (87%), the indication for resection was preoperative focal enlargement in the pancreatic head; two patients had an expansion of the tail. Six patients (40%), all men with a median age of 53 (46-67) years, were diagnosed with AIP type 1. Nine patients (60%), six men and three women with a median age of 58 (35-64) years had pathological findings consistent with AIP type 2.

In six patients (40%) with AIP (two AIP type 1 and four AIP type 2), a PC was also present in the resected tissue (Figure 1A-D). In five patients the cancer was localized in the head of the pancreas and in one patient the pancreatic tail was affected. The characteristics of AIP patients with and without PC are

Table 1 Characteristics of patients with autoimmune pancreatitis and autoimmune pancreatitis + pancreatic cancer *n* (%)

	AIP without PC	AIP with PC	<i>P</i> value
Total	9 (60)	6 (40)	
AIP type 1	4 (44)	2 (33)	
AIP type 2	5 (56)	4 (67)	
Sex (males)	6 (67)	6 (100)	
Age	49 (35-64)	60.5 (54-67)	0.045
Smoking	5 (56)	4 (67)	
Recent onset of diabetes mellitus	1 (11)	4 (67)	0.090
History of another autoimmune disorder	4 (44) ¹	0	
History of pancreatic disease	5 (56) ²	1 (17) ²	
Jaundice	3 (33)	4 (67)	
Weight loss	6 (67)	6 (100)	
in kilograms	8.5 (3-12)	15.5 (8-50)	0.030
Location of lesion (head of the pancreas)	8 (89)	5 (83)	
Ca 19-9 (normal range 0-27 kU/L)	35.2 (2.5-300)	89.8 (19.8-110)	

¹1 × IgG4-related sclerosing cholangitis, 1 × IgG4-related sialadenitis, 1 × Crohn's disease, 1 × Autoimmune thyroiditis; ²2 × Chronic pancreatitis, 3 × Acute pancreatitis; ³1 × Chronic pancreatitis. Quantitative data are expressed as median (range), qualitative data as absolute values with percentages. AIP: Autoimmune pancreatitis; PC: Pancreatic cancer.

Table 2 Histopathology findings in patients with type 1 autoimmune pancreatitis + pancreatic cancer

Patient	Sex	Age	Periductal lymphoplasmacytic infiltrate without granulocytic infiltration	Obliterative phlebitis	Storiform fibrosis	IgG4-positive cells
2	M	67	Yes	Yes	Yes	47/HPF
6	M	61	Yes	Yes	Yes	58/HPF

HPF: High-power field.

Table 3 Histopathology findings in patients with type 2 autoimmune pancreatitis + pancreatic cancer

Patient	Sex	Age	Granulocytic infiltration of duct wall (GEL)	Granulocytic and lymphoplasmacytic acinar infiltrate	IgG4-positive cells
1	M	54	Yes		4/HPF
3	M	63	Yes		2/HPF
4	M	58	Yes		7/HPF
5	M	60	Yes		4/HPF

HPF: High-power field.

shown in Table 1. All patients with AIP and PC were men, and their median age was 60.5 (54-67) years. All patients with AIP + PC had a history of significant weight loss (median 15.5kg, range 8-50), which was greater than the weight loss present in the six AIP patients without PC (median 8.5kg, range 3-12, *P* = 0.03). Patients with AIP + PC were significantly older (median age 60.5 vs 49, *P* = 0.045) and were more likely to have been diagnosed with recent-onset diabetes mellitus (within six months prior to resection) in the preoperative period (67% vs 11%, *P* = 0.09). History of smoking was similar in both groups (56% AIP patients vs 67% AIP + PC patients). There was not a statistically significant difference in the presence of jaundice between the groups. Histopathological findings in patients with AIP + PC are summarized in Tables 2 and 3.

Six patients with AIP had a history of pancreatic disease - three had chronic pancreatitis (two with AIP and one with AIP + PC), and three patients

with AIP alone had experienced an acute episode of pancreatitis of unspecified etiology. Four patients with AIP and none with AIP + PC had a history of other autoimmune diseases. Two patients with AIP type 1 had an involvement of other organs (IgG4-sclerosing cholangitis and sialadenitis) manifesting during postsurgical follow-up. One patient with AIP type 1 had autoimmune thyroiditis, and one patient with AIP type 2 had a history of Crohn's disease.

In eleven patients (seven with AIP and four with AIP + PC), a fine needle aspiration biopsy (FNAB) of the pancreatic lesion had been performed. Cytological examination of the aspirates from the AIP + PC patients was true positive in three and inconclusive in one. In those with AIP, the examination was true negative in four patients, false-positive in two, and inconclusive in one (Table 4).

Knowing the final histological diagnosis, we retrospectively evaluated the medical histories, imaging findings, and laboratory results of patients with

Table 4 Serum IgG4, imaging methods and fine needle aspiration biopsy results in patients with autoimmune pancreatitis and autoimmune pancreatitis + pancreatic cancer

	Sex	Age	Serum IgG4 (mg/dL)	CT	ERP	EUS	EUS-FNA
AIP type 1 + PC	M	67	N/A	A	N/A	N/A	N/A
	M	61	N/A	A	CBD stricture; no wirsungography	Susp M	Inconclusive
AIP type 1	M	46	81.5	L2	CBD stricture; no wirsungography	Ambiguous	Negative
	M	57	81.5	A	CBD stricture; no wirsungography	N/A	N/A
	M	49	N/A	A	Unsuccessful attempt for wirsungography	Cystic tumour; signs of CHP	Inconclusive
	M	48	23.1	L2	N/A	Susp M	Negative
AIP type 2 + PC	M	54	NR	L2	N/A	Ambiguous	Susp M
	M	63	NR	A	N/A	Ambiguous	Susp M
	M	58	NR	A	Wirsungolithiasis	N/A	N/A
	M	60	NR	A	N/A	Ambiguous	Susp M
AIP type 2	F	61	NR	L2	N/A	Susp M	Susp M
	F	64	NR	A	Dilated PD; mucous secretion	Susp MD-IPMN	Negative
	M	35	NR	L2	N/A	ambiguous	Susp M
	F	47	NR	L2	N/A	ambiguous	Negative
	M	53	NR	A	N/A	N/A	N/A

L2: Level 2 evidence of parenchymal imaging according to ICDC criteria; M: Male; F: Female; NR: Not relevant; N/A: Results not available or examination not done; A: Atypical-finding not suggestive of AIP; susp M: Findings suspected of malignancy; CHP: Chronic pancreatitis; CBD: Common bile duct; PD: Pancreatic duct; EUS: Endoscopic ultrasonography; EUS-FNA: Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy; CT: Computed tomography; AIP: Autoimmune pancreatitis; PC: Pancreatic cancer.

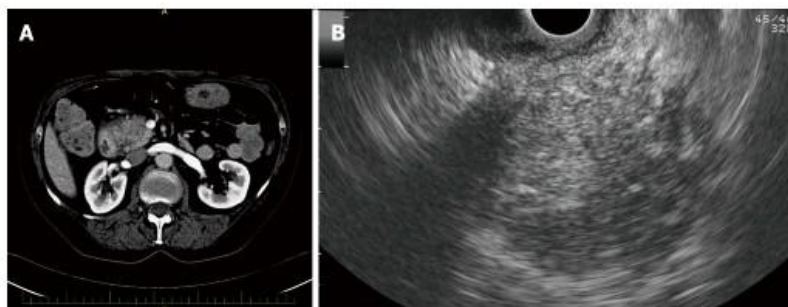


Figure 2 Imaging findings in a patient with autoimmune pancreatitis. A: Hypodense lesion in the pancreatic head on computed tomography; B: Hypoechoic lesion of the pancreatic head on endoscopic ultrasonography.

AIP + PC to assess the possibility of preoperative diagnosis of AIP using the current consensus criteria. None of the patients would have met the ICDC criteria preoperatively. Serum levels of IgG4 were not determined in the two patients with AIP type 1, and histology was not obtained in any of the AIP type 2 patients. Only one patient (with AIP type 2) had a CT finding suggestive of AIP, however malignant elements were found in the FNAB cytology. In the remaining five patients the CT findings would not have raised suspicion of AIP. Preoperative findings in both groups are shown in Table 4, Figures 2 and 3.

DISCUSSION

AIP and PC may present with similar manifestations,

but have very different treatments. Typically, an older patient presents with abdominal pain and obstructive jaundice caused by a focal pancreatic lesion. If AIP is diagnosed, the mainstay of treatment is immunosuppression using corticosteroids, usually resulting in rapid regression of the expansion and alleviation of symptoms. This therapy spares the patient from a challenging surgical procedure associated with high morbidity and considerable mortality. On the other hand, if pancreatic cancer is the cause of symptoms, the only chance for survival is prompt surgical treatment. Such clinical cases represent a complex diagnostic dilemma. Precise differential diagnosis of AIP and PC is essential for the right treatment and prognosis of patients, but is sometimes extremely difficult, if not impossible,

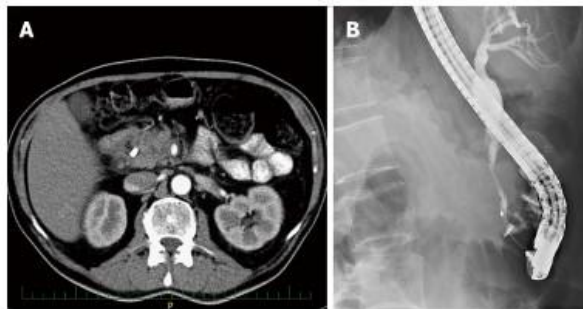


Figure 3 Imaging findings in a patient with autoimmune pancreatitis + pancreatic cancer. A: Hypodense lesion in the pancreatic head with a common bile duct (CBD) stent on computed tomography; B: Distal CBD stricture on endoscopic retrograde cholangio-pancreatography.

to determine. Serum markers of AIP (notably serum IgG4) are often helpful in diagnosis of both conditions^[12]. However, IgG4 levels exceeding twice the upper limit of normal were found in a considerable proportion of patients with pancreatic cancer and thus this marker cannot be used alone to exclude the diagnosis of malignancy^[13]. In cases where the presence of pancreatic cancer cannot be ruled out with certainty, pancreatic resection is indicated. The aim of our study was to evaluate the proportion of AIP in all patients undergoing resection for a suspected tumor. The finding of AIP in 5% of all resections in our patient series is in agreement with previously published data. The occurrence of AIP in patients resected for a suspected tumor has been shown to be around 6%-8%^[11]. This high number reflects the similar presentation of both diseases and the difficult diagnostic algorithm of AIP.

The relatively high proportion of patients with type 2 AIP (60%) in our series might be explained by a higher prevalence of this subtype in our geographic region as well as more frequent presentation of type 2 AIP as a focal pancreatic lesion^[14-16]. In addition, recognition of this subtype in the absence of a serological marker and extrapancreatic manifestations is more challenging. It can thus be assumed that this subtype will be found more often in patients with unrecognized AIP, and will not precisely match the characteristics of AIP patients in the general population.

An intriguing finding in our study is the high incidence of pancreatic adenocarcinoma in patients with AIP, which reached 40%. In our opinion, this represents the largest ever published group of patients with co-occurrence of PC and AIP. Pancreatic cancer in patients with AIP has so far been documented only in individual cases^[13,17-20]. Recently, two patients with both AIP and PC were described in a study that examined serum IgG4 level in 106 patients with histologically confirmed pancreatic cancer^[13]. None of our patients was diagnosed with AIP or had ever been given immunosuppressive therapy before surgery. A retrospective analysis of all available data revealed that our AIP patients would not have met the ICDC criteria

preoperatively. However, the diagnostic algorithm was not complete in any of them, as they were referred for surgery with an already established diagnosis of suspected pancreatic cancer. Nevertheless, it needs to be emphasized that some of our patients had been resected many years ago before AIP was thoroughly described and the ICDC criteria proposed.

Diagnosis of AIP accompanying PC based on histology is a major drawback of our study. We are aware that the nonspecific peritumoral pancreatitis adjacent to pancreatic neoplasms might share some histologic features with AIP type 1, *i.e.*, by abundance of IgG4+ plasma cells, venulitis or periductal inflammation^[21]. However, distribution of IgG4+ plasma cells in nonspecific peritumoral pancreatitis was shown to be patchy, in contrary to diffuse infiltration which is described in AIP^[22,23]. All cases of AIP + PC were reviewed by a pathologist specialized in pancreatic diseases. Only cases with diffuse distribution of IgG4+ plasma cells (density > 50/HPF) and with the presence of all morphologic features of AIP type 1 were included in the study. This cutoff was shown to provide an excellent specificity in distinguishing AIP type 1 and peritumoral pancreatitis^[21]. In AIP type 2 the granulocytic epithelial lesions were nosognostic for the disease.

The relationship between AIP and PC is poorly understood although several different explanations were formulated. The first one considers AIP as a precursor for pancreatic cancer due to chronic inflammation which leads to harboring of mutations and, over time, to development of cancer. Chronic pancreatitis is a well-known risk factor of pancreatic cancer, increasing the risk of cancer development by as much as 13.3-fold^[24]. The cumulative risk of developing pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis is estimated to be 4%^[25]. A similar association in patients with AIP has not yet been demonstrated. However, in line with the case reports of pancreatic cancer in patients with AIP mentioned above, there are data that indirectly support this assumption. For example, Gupta *et al.*^[26] in a retrospective analysis of resected tissue of AIP patients, found a higher prevalence of premalignant lesions, *i.e.*, pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN

1-2), in patients with AIP compared with patients with otherwise nonspecified chronic pancreatitis. In addition, they noted development of pancreatic cancer in two of 84 patients with AIP during a prospective 49-mo follow-up period. The high frequency of K-ras mutations found in pancreatic tissue of patients with AIP further supports the association of the two diseases^[27].

Higher incidence of pancreatic cancer has scarcely been reported in prospectively followed cohorts of patients with AIP^[28]. However, population studies are usually limited by a small number of patients due to the low incidence of the disease and also by short follow-up periods. Furthermore, prospectively followed patients with AIP are usually adequately treated with immunosuppression, unlike patients with unrecognized AIP or with pancreatitis of other etiologies. In such a scenario, one might speculate that suppression of inflammatory activity may reduce the risk of malignancy development in a similar way to that seen in inflammatory bowel disease^[29]. An increased incidence of pancreatic cancer would then be expected in untreated patients or in those with an insufficient response to immunosuppressive treatment. Duration of follow-up is also an important factor. If patients with chronic pancreatitis of other etiologies develop pancreatic cancer, then it is usually in the interval of one to two decades after chronic pancreatitis is diagnosed^[25]. There are patients suffering for years from unrecognized AIP in the absence of cardinal symptoms such as jaundice or typical radiological findings. Recently published data suggest that up to one third of patients with AIP can develop signs typical of advanced chronic pancreatitis of other etiologies (e.g., parenchymal atrophy or calcifications)^[30,31].

Another consideration proposes AIP type 1 as a paraneoplastic phenomenon. This hypothesis is based on observation of a significantly higher incidence of malignancy in patients with IgG4-RD within the first year of follow-up compared to subsequent years^[32,33]. The explanation would be that occult cancer may alter cell-mediated immunological responses and thus create an inflammatory environment favorable for onset of autoimmune disease - in this case AIP type 1 or any other IgG4-RD. However, these initial observations from Japanese authors were not further supported by western studies^[34,35].

Despite the small number of patients in our study, we found three major differences between patients with AIP and AIP + PC, with one of them being statistically significant. The significantly higher age of patients with AIP + PC may be somewhat expected due to the mechanism of cancer development, presumed to be a long-term chronic inflammatory process. It is consistent with the concept of pancreatic cancer being a late complication of chronic pancreatitis, much like colorectal cancer being a late complication of ulcerative colitis. The higher proportion of recent onset diabetes in patients with AIP + PC compared with patients with AIP only is an interesting

finding. Diabetes mellitus has been reported in 42%-78% of patients at the onset of AIP, however it persisted in only 10% of the AIP patients following corticosteroid treatment of the acute inflammation^[36]. In our study, recent-onset diabetes was present in only 11% patients with AIP. New onset diabetes mellitus as a symptom of pancreatic cancer has been documented in numerous studies^[37]. However, its use in the differential diagnosis of cancer and chronic pancreatitis is difficult, because diabetes is a common complication of advanced chronic pancreatitis of non-autoimmune etiology. In our study only six patients without PC had weight loss as opposed to all patients with PC. Weight loss in patients with AIP and PC was much greater than in those who had AIP without PC (15.5 kg vs 8.5 kg, $P = 0.03$). Even though exocrine pancreatic insufficiency and weight loss are not uncommon in patients with AIP^[38], a severe weight loss should raise suspicion for a possible presence of pancreatic cancer.

The possible synchronous occurrence of AIP and PC implies major clinical consequences. Our data indicate that distinguishing these two entities becomes even more challenging, as the preoperative diagnosis of AIP does not rule out pancreatic cancer. Even patients with an established diagnosis of AIP must thus be treated and followed with caution.

A shortcoming of our study, beyond its small size and retrospective nature, is the fact that the selection of patients was based on histological examination of resected tissue. Our hospital is a tertiary center that performs many resections as a service for regional gastroenterology facilities. Consequently, the opportunity to change the diagnostic algorithm, which is often not fully completed, is sometimes limited. Finally, the natural course of pancreatic cancer is so unfavorable that all our patients have already died. Consequently, they could not be reevaluated.

Autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer may have similar presentations and their distinction is often difficult. We evaluated all patients who underwent pancreatic resection for a focal pancreatic enlargement and found that a considerable proportion of the resected patients had autoimmune pancreatitis. Furthermore, we found that some patients with autoimmune pancreatitis also had pancreatic cancer, demonstrating the eventuality of synchronous presence of PC in patients with proven AIP. Our results show that those with AIP and cancer were older, more likely to have recent-onset diabetes and had a greater weight loss than those with AIP only. Definitive confirmation of these initial observations will require additional prospective studies with a larger number of patients.

COMMENTS

Background

Autoimmune pancreatitis (AIP) is a distinct form of chronic pancreatitis

characterized by specific clinical, laboratory, radiological and histological findings. AIP may mimic pancreatic cancer (PC), as it often presents with obstructive jaundice and focal pancreatic enlargement.

Research frontiers

Due to similar manifestation of AIP and PC, a lot of attention was given to the differentiation of the two conditions, as the precise differential diagnosis is essential for the right treatment and prognosis of patients. However, because the diagnosis of AIP is complex, many AIP patients undergo unnecessary surgery rather than immunosuppressive treatment. Chronic inflammatory process is a well-known risk factor of malignancy, as described in chronic pancreatitis and PC. A similar association in patients with AIP and PC has been suggested but not demonstrated. There are only a few cases of PC in AIP patients reported in the literature.

Innovations and breakthroughs

In the presented study, we show that a considerable proportion of patients undergoing pancreatic resection for a cancer suspicion may have AIP. However, we also showed that patients with AIP may have synchronous presence of pancreatic cancer. Those with AIP and PC were older, have been more often recently diagnosed with diabetes, and have experienced a greater weight loss than those without PC. The presented group of patients with PC and AIP co-occurrence is, to our knowledge, the largest ever published.

Applications

The possible synchronous occurrence of AIP and PC implies major consequences, as diagnosing AIP in a patient with focal pancreatic enlargement may not rule out the presence of pancreatic cancer. The knowledge of characteristics distinguishing the two groups of patients might aid in the differential diagnosis.

Terminology

Pancreatic cancer is usually an adenocarcinoma derived from pancreatic ductal cells; autoimmune pancreatitis is a rare chronic inflammatory disease of the pancreas defined by a combination of the following features: frequent presentation with obstructive jaundice accompanied with diffuse or focal organ swelling, rapid response to steroids, as well as by histological finding of lymphoplasmacytic infiltrate and fibrosis of the pancreas. Based on laboratory results, clinical profiling and histology, it is classified into type 1 and type 2.

Peer-review

"Simultaneous occurrence of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer in patients resected for focal pancreatic mass" is an interesting paper.

REFERENCES

- Nishimori I, Tamakoshi A, Otsuki M. Prevalence of autoimmune pancreatitis in Japan from a nationwide survey in 2002. *J Gastroenterol* 2007; **42** Suppl 18: 6-8 [PMID: 17520216 DOI: 10.1007/s00535-007-2043-y]
- Kanno A, Nishimori I, Masamune A, Kikuta K, Hirota M, Kuriyama S, Tsuji I, Shimosegawa T. Nationwide epidemiological survey of autoimmune pancreatitis in Japan. *Pancreas* 2012; **41**: 835-839 [PMID: 22466167 DOI: 10.1097/MPA.0b013e3182480c99]
- Pickartz T, Mayerle J, Lerch MM. Autoimmune pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; **4**: 314-323 [PMID: 17541445 DOI: 10.1038/ncpgasthep0837]
- Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M, Kim MH, Klöppel G, Lerch MM, Lohr M, Notohara K, Okazaki K, Schneider A, Zhang L. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatologists. *Pancreas* 2011; **40**: 352-358 [PMID: 21412117 DOI: 10.1097/MPA.0b013e3182142fd2]
- Klöppel G, Lüttges J, Lohr M, Zamboni G, Longnecker D. Autoimmune pancreatitis: pathological, clinical, and immunological features. *Pancreas* 2003; **27**: 14-19 [PMID: 12826900]
- Okazaki K, Kawa S, Kamisawa T, Naruse S, Tanaka S, Nishimori I, Ohara H, Ito T, Kiriya S, Inui K, Shimosegawa T, Koizumi M, Suda K, Shiratori K, Yamaguchi K, Yamaguchi T, Sugiyama M, Otsuki M. Clinical diagnostic criteria of autoimmune pancreatitis: revised proposal. *J Gastroenterol* 2006; **41**: 626-631 [PMID: 16932998 DOI: 10.1007/s00535-006-1868-0]
- Kim KP, Kim MH, Kim JC, Lee SS, Seo DW, Lee SK. Diagnostic criteria for autoimmune chronic pancreatitis revisited. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 2487-2496 [PMID: 16688792 DOI: 10.3748/wjg.v12.i16.2487]
- Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N, Zhang L, Clain JE, Pearson RK, Petersen BT, Vege SS, Farnell MB. Diagnosis of autoimmune pancreatitis: the Mayo Clinic experience. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; **4**: 1010-106; quiz 934 [PMID: 16843735]
- Sah RP, Chari ST. Autoimmune pancreatitis: an update on classification, diagnosis, natural history and management. *Curr Gastroenterol Rep* 2012; **14**: 95-105 [PMID: 22350841 DOI: 10.1007/s11894-012-0246-8]
- Frulloni L, Scattoni C, Falconi M, Zamboni G, Capelli P, Manfredi R, Graziani R, D'Onofrio M, Katsotourch AM, Amodio A, Benini L, Vantini I. Autoimmune pancreatitis: differences between the focal and diffuse forms in 87 patients. *Am J Gastroenterol* 2009; **104**: 2288-2294 [PMID: 19568232 DOI: 10.1038/ajg.2009.327]
- Sugumar A, Chari S. Autoimmune pancreatitis: an update. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; **3**: 197-204 [PMID: 19351289 DOI: 10.1586/egh.09.2]
- Morselli-Labate AM, Pezzilli R. Usefulness of serum IgG4 in the diagnosis and follow up of autoimmune pancreatitis: A systematic literature review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; **24**: 15-36 [PMID: 19067780 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05676.x]
- Bojková M, Dítě P, Dvořáčková J, Novotný I, Floreánová K, Kianička B, Uvířová M, Martínek A. Immunoglobulin G4, autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis* 2015; **33**: 86-90 [PMID: 25531501 DOI: 10.1159/000368337]
- Hart PA, Kamisawa T, Brugge WR, Chung JB, Culver EL, Czako L, Frulloni L, Go VL, Gress TM, Kim MH, Kawa S, Lee KT, Lerch MM, Liao WC, Lohr M, Okazaki K, Ryu JK, Schleinitz N, Shimizu K, Shimosegawa T, Soetikno R, Webster G, Yadav D, Zen Y, Chari ST. Long-term outcomes of autoimmune pancreatitis: a multicentre, international analysis. *Gut* 2013; **62**: 1771-1776 [PMID: 23232048 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303617]
- Sah RP, Chari ST, Pannala R, Sugumar A, Clain JE, Levy MJ, Pearson RK, Smyrk TC, Petersen BT, Topazian MD, Takahashi N, Farnell MB, Vege SS. Differences in clinical profile and relapse rate of type 1 versus type 2 autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology* 2010; **139**: 140-148; quiz e12-13 [PMID: 20353791 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.03.054]
- Kamisawa T, Chari ST, Giday SA, Kim MH, Chung JB, Lee KT, Werner J, Bergmann F, Lerch MM, Mayerle J, Pickartz T, Lohr M, Schneider A, Frulloni L, Webster GJ, Reddy DN, Liao WC, Wang HP, Okazaki K, Shimosegawa T, Kloppel G, Go VL. Clinical profile of autoimmune pancreatitis and its histological subtypes: an international multicenter survey. *Pancreas* 2011; **40**: 809-814 [PMID: 21747310 DOI: 10.1097/MPA.0b013e3182258a15]
- Ghazale A, Chari S. Is autoimmune pancreatitis a risk factor for pancreatic cancer? *Pancreas* 2007; **35**: 376 [PMID: 18090248 DOI: 10.1097/MPA.0b013e318073ccb8]
- Fukui T, Mitsuyama T, Takaoka M, Uchida K, Matsushita M, Okazaki K. Pancreatic cancer associated with autoimmune pancreatitis in remission. *Intern Med* 2008; **47**: 151-155 [PMID: 18239323]
- Loos M, Esposito I, Hedderich DM, Ludwig L, Fingerle A, Friess H, Klöppel G, Büchler P. Autoimmune pancreatitis complicated by carcinoma of the pancreatobiliary system: A case report and review of the literature. *Pancreas* 2011; **40**: 151-154

- 20 **Chandrasegaram MD**, Chiam SC, Nguyen NQ, Ruszkiewicz A, Chung A, Neo EL, Chen JW, Worthley CS, Brooke-Smith ME. A case of pancreatic cancer in the setting of autoimmune pancreatitis with nondiagnostic serum markers. *Case Rep Surg* 2013; **2013**: 809023 [PMID: 23781378 DOI: 10.1155/2013/809023]
- 21 **Dhall D**, Suriawinata AA, Tang LH, Shia J, Klimstra DS. Use of immunohistochemistry for IgG4 in the distinction of autoimmune pancreatitis from peritumoral pancreatitis. *Hum Pathol* 2010; **41**: 643-652 [PMID: 20149413 DOI: 10.1016/j.humpath.2009.10.019]
- 22 **Deshpande V**, Chicano S, Finkelberg D, Selig MK, Mino-Kenudson M, Brugge WR, Colvin RB, Lauwers GY. Autoimmune pancreatitis: a systemic immune complex mediated disease. *Am J Surg Pathol* 2006; **30**: 1537-1545 [PMID: 17122509 DOI: 10.1097/01.pas.0000213331.09864.2c]
- 23 **Zhang L**, Notohara K, Levy MJ, Chari ST, Smyrk TC. IgG4-positive plasma cell infiltration in the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Mod Pathol* 2007; **20**: 23-28 [PMID: 16980948 DOI: 10.1038/modpathol.3800689]
- 24 **Lowenfels AB**, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1433-1437 [PMID: 8479461 DOI: 10.1056/NEJM199305203282001]
- 25 **Raimondi S**, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis: aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; **24**: 349-358 [PMID: 20510834 DOI: 10.1016/j.bpg.2010.02.007]
- 26 **Gupta R**, Khosroshahi A, Shinagare S, Fernandez C, Ferrone C, Lauwers GY, Stone JH, Deshpande V. Does autoimmune pancreatitis increase the risk of pancreatic carcinoma?: a retrospective analysis of pancreatic resections. *Pancreas* 2013; **42**: 506-510 [PMID: 23271394 DOI: 10.1097/MPA.0b013e31826bf911]
- 27 **Kamisawa T**, Tsuruta K, Okamoto A, Horiguchi S, Hayashi Y, Yun X, Yamaguchi T, Sasaki T. Frequent and significant K-ras mutation in the pancreas, the bile duct, and the gallbladder in autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2009; **38**: 890-895 [PMID: 19752775 DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181b65a1c]
- 28 **Ikeura T**, Miyoshi H, Uchida K, Fukui T, Shimatani M, Fukui Y, Sumimoto K, Matsushita M, Takaoka M, Okazaki K. Relationship between autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer: a single-center experience. *Pancreatol* 2014; **14**: 373-379 [PMID: 25278307 DOI: 10.1016/j.pan.2014.04.029]
- 29 **Velayos FS**, Terdiman JP, Walsh JM. Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: a systematic review and metaanalysis of observational studies. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 1345-1353 [PMID: 15929768]
- 30 **Maire F**, Le Baleur Y, Rebours V, Vullierme MP, Couvelard A, Voittot H, Sauvanet A, Hentic O, Lévy P, Ruszniewski P, Hammel P. Outcome of patients with type 1 or 2 autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2011; **106**: 151-156 [PMID: 20736934 DOI: 10.1038/ajg.2010.314]
- 31 **Maruyama M**, Watanabe T, Kanai K, Oguchi T, Asano J, Ito T, Ozaki Y, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Kawa S. Autoimmune pancreatitis can develop into chronic pancreatitis. *Orphanet J Rare Dis* 2014; **9**: 77 [PMID: 24884922 DOI: 10.1186/1750-1172-9-77]
- 32 **Shiokawa M**, Kodama Y, Yoshimura K, Kawanami C, Mimura J, Yamashita Y, Asada M, Kikuyama M, Okabe Y, Inokuma T, Ohana M, Kokuryu H, Takeda K, Tsuji Y, Minami R, Sakuma Y, Kuriyama K, Ota Y, Tanabe W, Maruno T, Kurita A, Sawai Y, Uza N, Watanabe T, Haga H, Chiba T. Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2013; **108**: 610-617 [PMID: 23318486 DOI: 10.1038/ajg.2012.465]
- 33 **Asano J**, Watanabe T, Oguchi T, Kanai K, Maruyama M, Ito T, Muraki T, Hamano H, Arakura N, Matsumoto A, Kawa S. Association Between Immunoglobulin G4-related Disease and Malignancy within 12 Years after Diagnosis: An Analysis after Longterm Followup. *J Rheumatol* 2015; **42**: 2135-2142 [PMID: 26472416 DOI: 10.3899/jrheum.150436]
- 34 **Hart PA**, Law RJ, Dierkhising RA, Smyrk TC, Takahashi N, Chari ST. Risk of cancer in autoimmune pancreatitis: a case-control study and review of the literature. *Pancreas* 2014; **43**: 417-421 [PMID: 24622072 DOI: 10.1097/MPA.0000000000000053]
- 35 **Huggett MT**, Culver EL, Kumar M, Hurst JM, Rodriguez-Justo M, Chapman MH, Johnson GJ, Pereira SP, Chapman RW, Webster GJ, Barnes E. Type 1 autoimmune pancreatitis and IgG4-related sclerosing cholangitis is associated with extrapancreatic organ failure, malignancy, and mortality in a prospective UK cohort. *Am J Gastroenterol* 2014; **109**: 1675-1683 [PMID: 25155229 DOI: 10.1038/ajg.2014.223]
- 36 **Nishimori I**, Tamakoshi A, Kawa S, Tanaka S, Takeuchi K, Kamisawa T, Saisho H, Hirano K, Okamura K, Yanagawa N, Otsuki M. Influence of steroid therapy on the course of diabetes mellitus in patients with autoimmune pancreatitis: findings from a nationwide survey in Japan. *Pancreas* 2006; **32**: 244-248 [PMID: 16628078 DOI: 10.1097/01.mpa.0000202950.02988.07]
- 37 **Pannala R**, Basu A, Petersen GM, Chari ST. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol* 2009; **10**: 88-95 [PMID: 19111249 DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70337-1]
- 38 **Buijs J**, Cahen DL, van Heerde MJ, Rauws EA, de Buy Wenniger LJ, Hansen BE, Biemann K, Verheij J, Vleggaar FP, Brink MA, Beuers UH, van Buuren HR, Bruno MJ. The Long-Term Impact of Autoimmune Pancreatitis on Pancreatic Function, Quality of Life, and Life Expectancy. *Pancreas* 2015; **44**: 1065-1071 [PMID: 26355549 DOI: 10.1097/MPA.0000000000000451]

P-Reviewer: Castanon MS, Gonzalez-Ojeda A, Lin J, Manenti A, Pezzilli R **S-Editor:** Qi Y **L-Editor:** A **E-Editor:** Wang CH



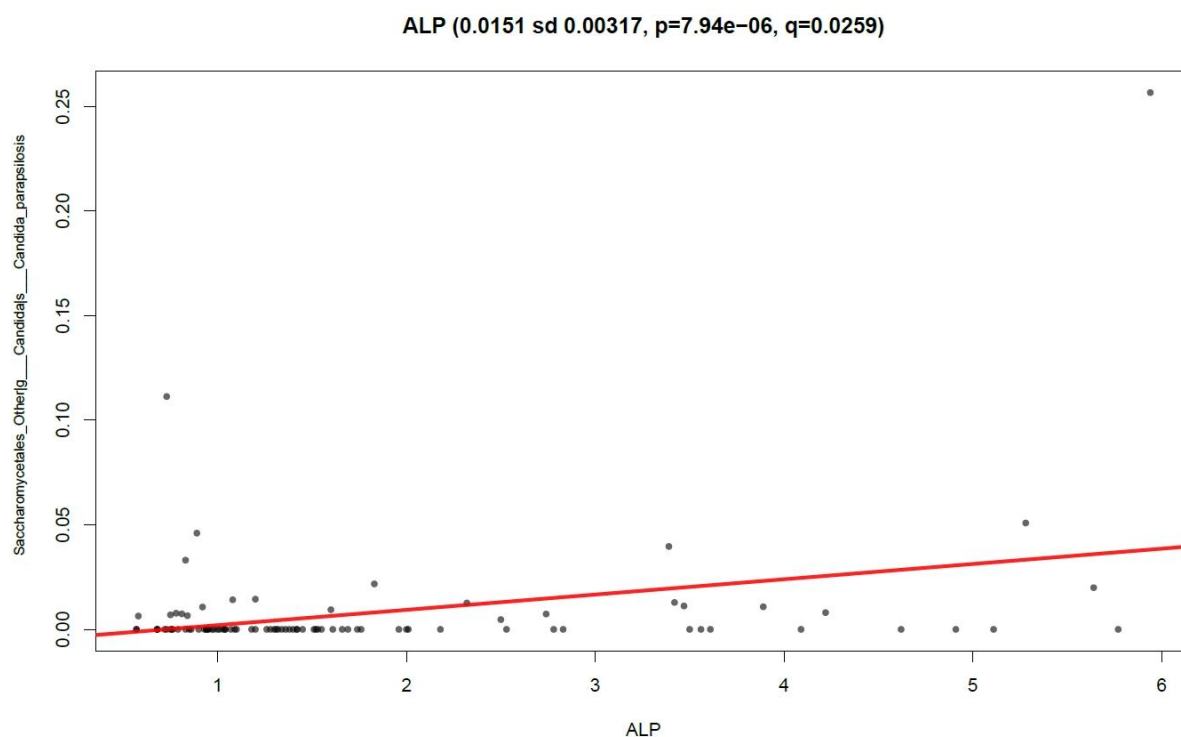
SOUHRNNÁ DISKUSE

Idiopatické střevní záněty představují skupinu chorob s celosvětově narůstající incidencí a z pohledu klinické gastroenterologie jde v dnešní době bezpochyby o jedno z nejzávažnějších témat. Jak bylo detailně popsáno v **Publikaci 1**, idiopatický střevní zánět asociovaný s primární sklerózující cholangitidou je pro svá klinická specifika v současné době vymezován jako samostatný fenotyp IBD, odlišný od lépe prozkoumaných onemocnění – Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy.¹² Hlavním cílem této disertační práce proto bylo definovat jednotlivé fenotypy, zejména pak právě PSC-IBD, skrze klíčové body v patogenezi, kterými jsou dysbióza, porucha střevní bariéry a aberantní imunitní odpověď.⁹⁹

Na základě současných poznatků lze s jistotou konstatovat, že „zdravá“ střevní mikrobiota je významným atributem lidské fyziologie. Její alterace naopak byla během poslední dekády prokázána u celé řady chorob, a to nejen gastrointestinálních.¹⁰⁰ V průběhu posledních desetiletí byla odbornou veřejností široce přijata klíčová role mikrobioty v patogenezi obvyklých fenotypů IBD, tedy CD a UC. S rozvojem sekvenačních technik nové generace (NGS) identifikovaly četné studie specifické změny jak v bakteriální diverzitě, tak i v relativním zastoupení jednotlivých taxonů ve stolici či kolonických slizničních biopsiích u pacientů s CD a UC v porovnání se zdravou populací.^{63, 101, 102} V přiložené **Publikaci 2** se podařilo prokázat, že kompozice střevní mikrobioty u PSC a PSC-IBD vykazuje specifickou signaturu, odlišnou od zdravých kontrol a UC. Navzdory použití vlastního originálního metodického protokolu se výsledné závěry studie z větší části překrývaly se závěry ostatních studií na dané téma, přestože vznikly v geograficky odlišných podmínkách. To lze interpretovat tak, že odlišné spouštějící faktory prostředí mohou vést k podobným změnám v mikrobiotě, které jsou s chorobou úzce asociované. Jedním z klíčových inovativních nálezů v kohortě pacientů z ČR byla těsná asociace vysoké četnosti bakteriálního rodu *Rothia* u PSC, a to bez ohledu na přítomnost konkomitantního střevního zánětu. Relevance závěrů dané studie vychází z obecně akceptovaného modelu patogeneze PSC, který je založen na aberantní bakteriální translokaci skrze zánětlivou střevní stěnu. V důsledku bariérové poruchy dochází dle této představy k portální bakteriémii a k úniku široké škály toxických substancí. Buněčné stěny mikrobů pak interagují s toll-like receptory (TLR) i jinými receptory, které rozpoznávají molekulární vzory (PRRs – pattern recognition receptors), jaterních makrofágů či dokonce

biliárního epitelu.¹⁰³ Může tak vznikat zánět žlučových s jejich následnou destrukcí a tvorbou striktur.

Přestože jsou bakterie dominantní složkou střevní mikrobioty, je pravděpodobné, že mohou významným způsobem vzájemně interagovat i s ostatními minoritními komponentami. Buňky střevní fungální flóry (mykobiomu) jsou řádově větší než bakterie, tvoří tak i při nižším celkovém počtu významnou buněčnou masu, a v patogenezi IBD mohou tedy taktéž sehrávat důležitou roli. Protilátky ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies) jsou nakonec mnoho let součástí běžné klinické praxe jako sérové markery Crohnovy choroby. Bylo také prokázáno, že některé složky mykobiomu mohou zvyšovat (např. *Candida albicans*), resp. snižovat, (např. *Saccharomyces boulardii*) náchylnost střevní sliznice k zánětu a že užívání antibiotik může akcelarovat fungální proliferaci.^{38, 104-106} V průlomové studii z roku 2017 Sokol et al. podrobně popisují specifické rysy mykobiomu u CD a UC.³⁸ Jelikož data pro PSC a PSC-IBD v tomto ohledu chyběla, rozšířili jsme analýzu našeho souboru vzorků stolice o sekvenaci genu pro ITS1. Předběžná data aktuální studie (Bajer et al. UEGW 2019. Abstract no. OP336) prokázala, že abundance vysoce virulentní kvasinky *Candida parapsilosis* stoupá úměrně s pokročilostí jaterního onemocnění u pacientů s PSC-IBD (Obr. 1).



Obr. 1: Narůstající četnost *C. parapsilosis* u PSC-IBD v závislosti na hladině ALP

Kernbauer et al. ve studii z roku 2014 dále demonstrovali, že eukaryotické viry (např. norovirus) mohou substituovat probiotickou roli bakterií a významně ovlivnit slizniční i systémovou imunitní odpověď.¹⁰⁷ Studie zaměřená na charakterizaci viromu u CD a UC navíc prokázala významnou asociaci obou konvenčních fenotypů IBD s expanzí bakteriofágů z řádu Caudovirales.¹⁰⁸ Data pro změny ve střevním viromu u PSC-IBD však, obdobně jako v případě mykobiomu, prozatím chybějí. Uvedené poznatky naznačují, že je v kontextu IBD (a všech jiných relevantních chorob) nutné vnímat střevní mikrobiom komplexně a zohledňovat vzájemné interakce mezi jeho jednotlivými komponentami. Z tohoto předpokladu budou v budoucnu patrně vycházet i snahy o terapeutickou manipulaci mikrobiomu (stěžejní současné poznatky na toto téma jsou shrnuty v **Publikaci 3**).

Jednotlivé formy IBD mají z klinického hlediska četná specifika, ale je pravděpodobné, že je jejich patogenetický základ obdobný.⁹⁹ Zásadním cílem výzkumu v oblasti IBD je identifikace snadno stanovitelných biomarkerů odlišujících navzájem jednotlivé fenotypy a predikující průběh choroby včetně míry terapeutické odpovědi. Studie prezentovaná v **Publikaci 4** odhalila několik sérových markerů (včetně markerů poruchy střevní bariéry), které nejen odlišují tři zkoumané typy IBD (CD, UC, PSC-IBD), ale také odrážejí aktivitu zánětu či druh podávané farmakologické léčby. Jedním z takových zajímavých nálezů byla zřetelná diskrepance sérových hladin EG-VEGF (Prokineticin 1) mezi dvěma hlavními fenotypy IBD – UC a CD. Monocyty stimulované Prokineticinem 1 vykazují při odpovědi proti endotoxinu zvýšenou produkci IL-12 a TNF- α a naopak sníženou produkci IL-10.¹⁰⁹ Nález tedy může reflektovat rozdílné mechanismy angiogeneze a regulace zánětlivé odpovědi mezi UC a CD.

Osteoprotegerin (OPG) je solubilní glykoprotein, jehož zvýšené sérové koncentrace byly v minulosti prokázány u celé řady zánětlivých chorob.¹¹⁰ Hladiny OPG v naší studii nejen citlivě odrážely použití anti-TNF léčby, ale především, společně s několika dalšími sérovými markery, navzájem významně odlišovaly jednotlivé fenotypy IBD, a to jak CD od UC, tak i UC od PSC-IBD.

Konstantní remodelace a reparace střevní mezibuněčné hmoty a pojivové tkáně jsou řízeny sekrecí matrixových metaloproteináz (MMPs) a jejich inhibitorů (TIMPs). Dysbalance mezi MMPs a TIMPs může vést ke vzniku pro IBD typických patomorfologických defektů, jako jsou vředové nebo fibrotické změny.¹¹¹ V našem studijním souboru jsme u pacientů s IBD (v porovnání se zdravými kontrolami) detekovali

snížené hladiny MMP-9 a naopak zvýšené koncentrace MMP-14. Pacienti s PSC-IBD pak vykazovali zvýšené hladiny TIMP-1. Tyto nálezy naznačují významnou roli matrixových metaloproteináz v patogenezi IBD.

Růstový faktor TGF- β sehrává díky své imunoregulační schopnosti a podpoře bariérové funkce důležitou úlohu v homeostáze střevní sliznice.¹¹² Vysoké hladiny TGF- β 1 byly v naší studii nejsilnějším faktorem spojeným s remisí IBD napříč fenotypy. Právě vysoké hodnoty TGF- β 1 mohou tedy odrážet úspěšnou protizánětlivou odpověď organismu u pacientů s IBD, a stanovení daného cytokinu tak může sehrát roli v predikci relapsu choroby či při zhodnocení efektu podávané terapie.

Jak bylo v práci opakovaně zmíněno, porucha střevní bariéry a následná expozice bakteriálních antigenů imunitním buňkám jsou klíčové body v patogenezi IBD.⁷⁵ V doložené studii jsme proto zkoumali posuny v protilátkové i buněčné imunitní odpovědi proti v české populaci prevalentním střevním bakteriím (identifikovaným v rámci **Publikace 2**) u pacientů s IBD. Naše data mimo jiné naznačují, že u pacientů s IBD dochází k poklesu protilátkové odpovědi proti bakterii *Faecalibacterium prausnitzii*, která je za fyziologických podmínek vysoce prevalentní a je jí přisuzována komplexní probiotická aktivita.¹¹³ Pomocí průtokové cytometrie se nám dále podařilo charakterizovat buněčnou imunitní odpověď v kontextu jednotlivých typů IBD, stadia choroby a podávané terapie.

Podrobná diskuse k jednotlivým dílčím výsledkům studie je uvedena v rámci **Publikace 4**.

V **Publikaci 5** jsme komplexně popsali klinické aspekty transplantace jater na největším (k datu publikace) českém souboru pacientů transplantovaných pro PSC. Zastoupení PSC v celkovém objemu LTx je zde více jak dvojnásobné v porovnání s aktuálními souhrnnými daty ELTR – Evropského registru pro transplantaci jater (10,2 % vs. 5 %); míra přežívání štěpů a pacientů po LTx pro PSC pak znatelně převyšuje celoevropský průměr.¹¹⁴ Tyto závěry byly potvrzeny i novější studií prezentovanou v **Publikaci 6**, kde se nadále zabýváme tuzemskými zkušenostmi s LTx pro PSC, se zvláštním zaměřením na problematiku rekurence PSC po transplantaci jater (rPSC).

Rekurentní forma PSC má pravděpodobně obdobné patogenetické rysy jako primární choroba a představuje obvyklou příčinu selhání jaterního štěpu u pacientů transplantovaných pro PSC.^{115, 116} Ze všech publikovaných studií na dané téma jsme v naší

práci popsali zatím nejvyšší frekvenci rPSC (44,7 %), a to na souboru pacientů s doposud nejdelším intervalem sledování po LTx (medián 122 měsíců). V návaznosti na předešlé práce jsme potvrdili úzký vztah rPSC a PSC-IBD a identifikovali vysoce rizikovou skupinu pacientů s rozvojem střevního zánětu de novo po transplantaci. Dalším významným rizikovým faktorem spojeným s rozvojem rPSC byla v našem souboru pacientů anamnesa alespoň jedné epizody akutní celulární rejekce jaterního štěpu. Několik předešlých studií prokázalo významnou asociaci některých variant v HLA systému jak s PSC¹¹⁷, tak s IBD¹¹⁸. U PSC je například známá protektivní úloha alely DRB1*04.¹¹⁷ V naší studii se mimo jiné podařilo potvrdit protektivní úlohu dané alely i u rPSC, což opět svědčí pro shodná patogenetická východiska u primární a rekurentní formy tohoto onemocnění. Závěry práce tedy ukazují na podstatnou úlohu genetické predispozice u této komplexní choroby postihující střeva a játra.

Vysoký výskyt kolorektálních neoplázií (kterými se v kontextu IBD detailně zabýváme v přehledové **Publikaci 7**) v našem souboru pacientů je v souladu s mezinárodními doporučeními silným argumentem pro provádění dispenzárních koloskopí u pacientů s PSC-IBD v relativně krátkých časových intervalech (zpravidla každé 1–2 roky).¹⁴ Nepříznivé přežívání našich transplantovaných pacientů s incidentálním nálezem cholangiocelulárního karcinomu v jaterním explantátu obdobně podporuje nutnost screeningu biliárních malignit (včetně karcinomu žlučníku) u pacientů s PSC¹¹⁹ a výhledově i pečlivé selekce kandidátů LTx pro tuto diagnózu (v době sepsání této práce zatím v ČR není součástí klinické praxe).¹²⁰

Autoimunitní pankreatitida je chorobou významně asociovanou s IBD. Dle dosavadních literárních pramenů není dostatečná evidence o zvýšeném riziku karcinomu pankreatu u AIP.¹²¹ V souladu se závěry **Publikace 8** se nám podařilo prokázat statisticky významný souběžný výskyt AIP a karcinomu slinivky u pacientů resekovaných pro fokální pankreatickou masu. Podrobně je téma diskutované v rámci dané Publikace.

ZÁVĚR A SHRNUÍ

Idiopatické střevní záněty tvoří heterogenní skupinu chorob, patogenetický základ je však pravděpodobně u všech známých fenotypů obdobný. Jeho hlavními pilíři jsou dle dosavadních znalostí především genetická predispozice, střevní mikrobiota, porucha střevní bariéry a patologická imunitní odpověď. Žádný z uvedených faktorů nezpůsobuje onemocnění sám o sobě, každý je však prokazatelně společnou součástí určité „mozaiky“, skrývající se za patogenezi těchto stále více rozšířených chorob. Dle tohoto komplexního principu se bude v blízké budoucnosti bezpochyby ubírat i vývoj nových prostředků farmakologické léčby.

V souladu se stanovenými cíli práce se nám v jednotlivých studiích podařilo rozšířit poznatky ve zmíněných klíčových aspektech patogeneze, s mimořádným důrazem na vztah k primární sklerózující cholangitidě, a dále pak k transplantaci jater a riziku vzniku neoplazií. Závěry této práce v budoucnu napomohou přesnějšímu rozklíčování etiopatogenetických souvislostí, stanovení relevantních biomarkerů pro klinickou praxi a identifikaci rizikových skupin pacientů.

LITERÁRNÍ REFERENCE

Vztahující se k úvodu a diskusi:

1. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2014;20:91-9.
2. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:205-17.
3. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 2018;390:2769-2778.
4. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19 Suppl A:5A-36A.
5. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009;361:2066-78.
6. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749-53.
7. Khalili H, Burke KE, Roelstraete B, et al. Microscopic Colitis and Risk of Inflammatory Bowel Disease in a Nationwide Cohort Study. *Gastroenterology* 2020.
8. Saarinen S, Olerup O, Broome U. Increased frequency of autoimmune diseases in patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3195-9.
9. Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, et al. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review. *J Hepatol* 2017;67:1298-1323.
10. Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, et al. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 2018;391:2547-2559.
11. Fung BM, Lindor KD, Tabibian JH. Cancer risk in primary sclerosing cholangitis: Epidemiology, prevention, and surveillance strategies. *World J Gastroenterol* 2019;25:659-671.
12. Loftus EV, Jr., Harewood GC, Loftus CG, et al. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2005;54:91-6.
13. de Vries AB, Janse M, Blokzijl H, et al. Distinctive inflammatory bowel disease phenotype in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2015;21:1956-71.
14. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis* 2017;11:649-670.
15. Gomollon F, Dignass A, Annese V, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017;11:3-25.
16. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J Crohns Colitis* 2017;11:769-784.

17. Sands BE, Taub PR, Armuzzi A, et al. Tofacitinib Treatment Is Associated With Modest and Reversible Increases in Serum Lipids in Patients With Ulcerative Colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020;18:123-132 e3.
18. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis* 2017;11:135-149.
19. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease pathogenesis: where are we? *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30 Suppl 1:12-8.
20. de Souza HSP, Fiocchi C, Iliopoulos D. The IBD interactome: an integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:739-749.
21. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, et al. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *Am J Gastroenterol* 2015;110:564-71.
22. Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1-5.
23. Duerr RH. Genome-wide association studies herald a new era of rapid discoveries in inflammatory bowel disease research. *Gastroenterology* 2007;132:2045-9.
24. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
25. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:1118-25.
26. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
27. Abraham C, Cho J. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1090-100.
28. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119-24.
29. Turpin W, Goethel A, Bedrani L, et al. Determinants of IBD Heritability: Genes, Bugs, and More. *Inflamm Bowel Dis* 2018;24:1133-1148.
30. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, et al. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:1193-8.
31. Stylianou E. Epigenetics: the fine-tuner in inflammatory bowel disease? *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29:370-7.
32. Karatzas PS, Gazouli M, Safioleas M, et al. DNA methylation changes in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 2014;27:125-132.
33. Krautkramer KA, Kreznar JH, Romano KA, et al. Diet-Microbiota Interactions Mediate Global Epigenetic Programming in Multiple Host Tissues. *Mol Cell* 2016;64:982-992.
34. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
35. Beller L, Matthijnsens J. What is (not) known about the dynamics of the human gut virome in health and disease. *Curr Opin Virol* 2019;37:52-57.
36. Santiago-Rodriguez TM, Hollister EB. Human Virome and Disease: High-Throughput Sequencing for Virus Discovery, Identification of Phage-Bacteria Dysbiosis and Development of Therapeutic Approaches with Emphasis on the Human Gut. *Viruses* 2019;11.

37. Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 2017;5:153.
38. Sokol H, Leducq V, Aschard H, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2017;66:1039-1048.
39. Sereme Y, Mezouar S, Grine G, et al. Methanogenic Archaea: Emerging Partners in the Field of Allergic Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2019.
40. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014;159:789-99.
41. van der Waaij D, Berghuis JM, Lekkerkerk JE. Colonization resistance of the digestive tract of mice during systemic antibiotic treatment. *J Hyg (Lond)* 1972;70:605-10.
42. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:859-904.
43. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:313-23.
44. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol* 2014;16:1024-33.
45. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:39-49.
46. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 2014;15:382-392.
47. Seksik P, Sokol H, Lepage P, et al. Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24 Suppl 3:11-8.
48. Kverka M, Tlaskalova-Hogenova H. Two faces of microbiota in inflammatory and autoimmune diseases: triggers and drugs. *APMIS* 2013;121:403-21.
49. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994;180:2359-64.
50. Machiels K, Joossens M, Sabino J, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014;63:1275-83.
51. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412-21.
52. Turpin W, Espin-Garcia O, Xu W, et al. Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nat Genet* 2016;48:1413-1417.
53. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008;6:e280.
54. Ungaro R, Bernstein CN, Gearry R, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1728-38.
55. Drastich P, Bajer L, Kverka M. Possibilities of therapeutic manipulation of the gut microbiota. *Vnitr Lek*;64:665-671.
56. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014;14:189.
57. Brandtzaeg P. The gut as communicator between environment and host: immunological consequences. *Eur J Pharmacol* 2011;668 Suppl 1:S16-32.

58. Coskun M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Front Med (Lausanne)* 2014;1:24.
59. Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 2014;158:1000-1010.
60. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, et al. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1165-79.
61. Roda G, Sartini A, Zamboni E, et al. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2010;16:4264-71.
62. Jager S, Stange EF, Wehkamp J. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg* 2013;398:1-12.
63. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol* 2011;8:110-20.
64. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, et al. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 1999;117:65-72.
65. Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:362-81.
66. Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res* 2015;13:11-8.
67. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56:61-72.
68. Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, et al. Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008;135:173-84.
69. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2014;36:166-76.
70. Tanaka H, Takechi M, Kiyonari H, et al. Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut* 2015;64:1529-38.
71. Teshima CW, Dieleman LA, Meddings JB. Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1258:159-65.
72. Chang J, Leong RW, Wasinger VC, et al. Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing. *Gastroenterology* 2017;153:723-731 e1.
73. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, et al. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102:448-55.
74. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012;336:1268-73.
75. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:13-27.
76. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;28:454-67.
77. Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, et al. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med* 2009;206:1883-97.
78. Hegazy AN, West NR, Stubbington MJT, et al. Circulating and Tissue-Resident CD4(+) T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy

- Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology* 2017;153:1320-1337 e16.
79. Fiocchi C. Tailoring Treatment to the Individual Patient - Will Inflammatory Bowel Disease Medicine Be Personalized? *Dig Dis* 2015;33 Suppl 1:82-89.
 80. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-61.
 81. Geremia A, Jewell DP. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;6:223-37.
 82. Stappenbeck TS, Rioux JD, Mizoguchi A, et al. Crohn disease: a current perspective on genetics, autophagy and immunity. *Autophagy* 2011;7:355-74.
 83. Shanahan F. The gut microbiota-a clinical perspective on lessons learned. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:609-14.
 84. Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E. Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *J Crohns Colitis* 2011;5:279-86.
 85. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004;3:394-400.
 86. Garg M, Lubel JS, Sparrow MP, et al. Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease--established concepts and future directions. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:324-44.
 87. Ananthakrishnan AN, Higuruchi LM, Huang ES, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012;156:350-9.
 88. Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005;54:1481-91.
 89. Saidel-Odes L, Odes S. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 2014;27:189-190.
 90. Rubin DT, Huo D, Kinnucan JA, et al. Inflammation is an independent risk factor for colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:1601-8 e1-4.
 91. Halling ML, Kjeldsen J, Knudsen T, et al. Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases. *World J Gastroenterol* 2017;23:6137-6146.
 92. Notohara K, Burgart LJ, Yadav D, et al. Idiopathic chronic pancreatitis with periductal lymphoplasmacytic infiltration: clinicopathologic features of 35 cases. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1119-27.
 93. Kamisawa T, Chari ST, Giday SA, et al. Clinical profile of autoimmune pancreatitis and its histological subtypes: an international multicenter survey. *Pancreas* 2011;40:809-14.
 94. Tsen A, Alishahi Y, Rosenkranz L. Autoimmune Pancreatitis and Inflammatory Bowel Disease: An Updated Review. *J Clin Gastroenterol* 2017;51:208-214.
 95. Ueki T, Kawamoto K, Otsuka Y, et al. Prevalence and clinicopathological features of autoimmune pancreatitis in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Pancreas* 2015;44:434-40.
 96. Park SH, Kim D, Ye BD, et al. The characteristics of ulcerative colitis associated with autoimmune pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2013;47:520-5.
 97. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, et al. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;24:349-58.

98. Macinga P, Pulkertova A, Bajer L, et al. Simultaneous occurrence of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer in patients resected for focal pancreatic mass. *World J Gastroenterol* 2017;23:2185-2193.
99. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008;134:577-94.
100. Hogenova HT, Zakostelska ZJ, Petanova J, et al. Microbiota, immunity and immunologically-mediated diseases. *Vnitr Lek* 2019;65:98-107.
101. Packey CD, Sartor RB. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J Intern Med* 2008;263:597-606.
102. Hold GL, Smith M, Grange C, et al. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol* 2014;20:1192-210.
103. Harada K, Ohira S, Isse K, et al. Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. *Lab Invest* 2003;83:1657-67.
104. Mavromanolakis E, Maraki S, Cranidis A, et al. The impact of norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin on human gut colonization by *Candida albicans*. *Scand J Infect Dis* 2001;33:477-8.
105. Jawhara S, Thuru X, Standaert-Vitse A, et al. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* 2008;197:972-80.
106. McIlroy J, Ianiro G, Mukhopadhyaya I, et al. Review article: the gut microbiome in inflammatory bowel disease-avenues for microbial management. *Aliment Pharmacol Ther* 2018;47:26-42.
107. Kernbauer E, Ding Y, Cadwell K. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature* 2014;516:94-8.
108. Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 2015;160:447-60.
109. Wu L, Ruffing N, Shi X, et al. Discrete steps in binding and signaling of interleukin-8 with its receptor. *J Biol Chem* 1996;271:31202-9.
110. Augoulea A, Vrachnis N, Lambrinoudaki I, et al. Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis in diabetic patients. *Int J Endocrinol* 2013;2013:182060.
111. Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Davidi IP, et al. Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) - 1 and - 4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol* 2008;8:55.
112. Planchon SM, Martins CA, Guerrant RL, et al. Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J Immunol* 1994;153:5730-9.
113. Miquel S, Martin R, Rossi O, et al. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:255-61.
114. Adam R, Karam V, Cailliez V, et al. 2018 Annual Report of the European Liver Transplant Registry (ELTR) - 50-year evolution of liver transplantation. *Transpl Int* 2018;31:1293-1317.
115. Fosby B, Karlsen TH, Melum E. Recurrence and rejection in liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2012;18:1-15.
116. Rowe IA, Webb K, Gunson BK, et al. The impact of disease recurrence on graft survival following liver transplantation: a single centre experience. *Transpl Int* 2008;21:459-65.

117. Donaldson PT, Norris S. Evaluation of the role of MHC class II alleles, haplotypes and selected amino acid sequences in primary sclerosing cholangitis. *Autoimmunity* 2002;35:555-64.
118. Ahmad T, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World J Gastroenterol* 2006;12:3628-35.
119. European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009;51:237-67.
120. Goldaracena N, Gorgen A, Sapisochin G. Current status of liver transplantation for cholangiocarcinoma. *Liver Transpl* 2018;24:294-303.
121. Majumder S, Takahashi N, Chari ST. Autoimmune Pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2017;62:1762-1769.